

Université de Montréal

**Caractérisation de l'adipogenèse et des voies de la lipolyse dans les
cellules adipocytaires normales et déficientes en lipases**

Par

Meriem Semache

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade maîtrise ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

Août 2006

© Meriem Semache, 2006



W

4

U58

2007

v. 018

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Caractérisation de l'adipogenèse et des voies de la lipolyse dans les
cellules adipocytaires normales et déficientes en lipases**

Présenté par :
Meriem Semache

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Edgard Delvin
Président rapporteur

Dr. Grant A. Mitchell
Directeur de recherche

Dr. André Tremblay
Membre du jury

RÉSUMÉ

La lipolyse adipocytaire est une composante majeure du métabolisme lipidique qui est étroitement lié à l'obésité, un problème majeur dans notre société. La lipolyse consiste en la libération du glycérol et des acides gras à partir des triglycérides (TG) adipocytaires. Nous étudions l'appareil lipolytique et en particulier, deux lipases : la lipase hormono-sensible (LHS) et sa stimulation β_3 -adrénergique et l'hydrolase des triglycérides (TGH).

Ce projet porte sur les préadipocytes 3T3-F442A et les fibroblastes embryonnaires de souris. Ces modèles de culture *in vitro* permettent d'étudier l'adipocyte en dehors de l'influence des autres organes. Nous avons démontré qu'après différenciation *in vitro*, ces cellules accumulent les TG, expriment des gènes adipocytaires (ex : LHS, périlipine) et sécrètent le glycérol et les adipocytokines. Les fibroblastes déficients en LHS se différencient normalement, leur lipolyse basale est maintenue, mais leur réponse β_3 -adrénergique est atténuée d'environ 30 %.

La lipolyse des 3T3-F442A différenciées a été suivie sur une période de 24 heures. La lipolyse basale constitue une fraction majeure de l'activité totale. La stimulation β_3 -adrénergique déclenche une lipolyse intense, mais transitoire. L'effet de la cytokine TNF- α est modeste, mais soutenu et potentiellement important sur le plan physiologique. Dans une lignée où la TGH est supprimée par interférence à l'ARN, l'activité lipolytique totale est moindre (~ 30 à 40 %) que celle de la lignée témoin.

Les outils développés dans ce projet permettront d'explorer l'importance de la lipolyse basale et le rôle de TGH et des autres composantes de l'appareil lipolytique dans l'équilibre énergétique et l'obésité.

Mots clés : Adipocytes, lipolyse, lipase hormono-sensible, TGH, adipocytokines, différenciation en culture, stimulation β_3 -adrénergique, TNF- α , interférence à l'ARN.

ABSTRACT

Adipocyte lipolysis is a major component of lipid metabolism, which in turn is closely related to obesity, a major problem in our society. Lipolysis consists of the release of glycerol and fatty acids from triglycerides (TG). Our laboratory studies the lipolytic apparatus, particularly two lipases : hormone-sensitive lipase (HSL) and its β_3 -adrenergic stimulation and triglyceride hydrolase (TGH).

In this project, we use 3T3-F442A preadipocytes and mouse embryonic fibroblasts. In these models of *in vitro* cell culture, we can study the adipocyte without the influence of other organs. We showed that after *in vitro* differentiation, these cells accumulate TG, express adipocyte gene markers (ex: HSL, perilipin) and secrete glycerol and adipocytokines. HSL-deficient embryonic fibroblasts differentiate normally. Their basal lipolysis is maintained, but their β_3 -adrenergic response is suppressed by about 30 %.

Lipolysis in differentiated 3T3-F442A has been characterized over a 24-hour period. Basal lipolysis contributes a major fraction of total lipolytic activity. β_3 -adrenergic response was high but transient. TNF- α stimulation was modest, but persisted throughout the 24-hour period and thus may be potentially important at the physiological level. In a cell line in which TGH was suppressed by RNA interference, total lipolytic activity was reduced by 30 to 40 % compared to the control.

This work provides tools which to study the importance of basal lipolysis and the roles of TGH and other components of lipolysis, in energy balance and obesity.

Key words : Adipocytes, lipolysis, Hormone-Sensitive Lipase, TGH, adipocytokines, cell culture, differentiation, β_3 -adrenergic stimulation, TNF- α , RNA interference.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1	Obésité et maladies cardiovasculaires	18
1.2	Métabolisme des lipides	18
1.3	Physiologie du tissu adipeux	22
1.4	Modèles d'étude du tissu adipeux	23
1.5	Régulation transcriptionnelle de l'adipogenèse	25
1.5.1	PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)	28
1.5.2	C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein)	31
1.5.3	ADD1 /SREBP	32
1.6	Le tissu adipeux en tant qu'organe endocrine	32
1.6.1	Leptine	33
1.6.2	Adiponectine	34
1.6.3	TNF- α	34
1.6.4	IL-6	35
1.6.5	Visfatine	35
1.6.6	RBP4 (Retinol-binding protein 4)	36

1.7	L'activité lipolytique adipocytaire	37
1.8	La lipase hormono-sensible (LHS) :	39
1.8.1	Propriétés structurales et enzymatiques	39
1.8.2	Profil d'expression et rôles tissulaires de la LHS :	40
1.8.3	Régulation de la lipase hormono-sensible par phosphorylation réversible :	45
1.8.4	Régulation de la spécificité tissulaire :	46
1.8.5	Régulation hormonale et physiologique.....	47
1.9	TGH (<i>triacylglycerol hydrolase</i>).....	48
1.9.1	Propriétés structurales et enzymatiques	48
1.9.2	Profil d'expression tissulaire de la TGH	53
1.9.3	Régulation transcriptionnelle de la TGH :	56
1.9.4	Régulation hormonale et nutritionnelle de la TGH :	57
1.9.5	Régulation post-traductionnelle de la TGH :	58
1.10	ATGL (adipose triglyceride lipase) :	59
1.9.1	Propriétés structurales et enzymatiques	60
1.9.2	Profil d'expression de l'ATGL :	60
1.9.3	Régulation hormonale et nutritionnelle.....	61
1.11	Mécanismes moléculaires régulant la lipolyse	62
1.11.1	Voie de la PKA :	62
1.11.2	Voie indépendantes de la PKA.....	63
1.12	L'appareil lipolytique	63
1.13	Les différentes modalités pour étudier les adipocytes :	65

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1	Matériel	71
2.2	Culture primaire de fibroblastes embryonnaires de souris.....	71

2.3	Isolation de l'ADN	71A
2.4	Génotypage.....	71A
2.5	Différenciation des cellules fibroblastes embryonnaires en culture.....	71A
2.6	Culture et différenciation des préadipocytes NIH 3T3-F442A	71B
2.7	Coloration à l'Huile Rouge	74
2.8	Isolation de l'ARN et quantification par PCR en temps réel	74
2.9	Lipolyse	75
2.10	Dosage du glycérol	75
2.11	Extraction et quantification des lipides	77
2.12	Dosage de la leptine	78
2.13	Dosage de l'adiponectine	78
2.14	Immunobuvardage.....	79
2.15	Interférence à l'ARN	80
2.16	Statistiques.....	84

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

3.1	Préadipocytes NIH 3T3-F442A.....	86
3.1.1	Différenciation des cellules 3T3-F442A	86
3.1.2	Lipolyse dans les cellules 3T3-F442A différenciées	92
3.2	Fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/-	97
3.1.3	Caractérisation de la différenciation des fibroblastes embryonnaires.....	97
3.1.4	Lipolyse dans les cellules fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- différenciées	102

3.1.5	Sécrétion de l'adiponectine dans les cellules fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS -/- différenciées	102
3.3	Atténuation de l'expression de TGH par interférence à l'ARN	106
3.1.6	Construction des clones et transfection	106
3.1.7	Détection de l'expression de la TGH dans les cellules 3T3-F442A-siTGH2 différenciées	107
3.1.8	La lipolyse dans les cellules 3T3-F442A-siTGH2 différenciées	107

CHAPITRE 4 DISCUSSION

4.1	Préadipocytes 3T3-F442A.....	112
4.1.1	Différenciation des 3T3-F442A : considérations techniques :	112
	Mise au point du protocole de différenciation des cellules 3T3-F442A	112
	Caractérisation de la différenciation des cellules 3T3-F442A	112
	Étude de la transcription dans les cellules 3T3-F442A différenciées	113
4.1.2	La lipolyse dans les adipocytes 3T3-F442A :	117
	Mise au point de la lipolyse dans les cellules différenciées en culture	117
	Profil lipolytique des cellules 3T3-F442A différenciées	118
4.2	Fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/-	122
4.2.1	Différenciation des fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- : ...	122
4.2.2	La lipolyse dans les fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- différenciés :	123
4.2.3	Sécrétion de l'adiponectine par les fibroblastes embryonnaires	
	LHS+/+ et LHS-/- différenciés :	125
4.3	Atténuation de l'expression de la TGH dans les cellules 3T3-F442A par	

interférence à l'ARN	125
4.4 Perspectives	127
SOURCES DOCUMENTAIRES.....	130

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Rôle du tissu adipeux dans le métabolisme lipidique en relation avec quelques autres organes.
- Figure 2** La lipolyse et la lipogenèse à l'intérieur de l'adipocyte
- Figure 3** Évolution de la transcription des gènes adipocytaires suite à l'induction de la différenciation des cellules par l'ajout du IBMX, du dexaméthasone et de l'insuline.
- Figure 4** Différenciation adipocytaire.
- Figure 5** Structure du gène de la LHS de souris et de la protéine correspondante.
- Figure 6** Organisation des exons et introns du gène de la TGH de souris.
- Figure 7** Organisation des exons et introns du gène de l'ATGL de souris.
- Figure 8** Hypothèse du bourgeonnement de la gouttelette lipidique à partir du réticulum endoplasmique.
- Figure 9** Théorie de l'assemblage des gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique (RE).

- Figure 10** Hypothèse d'un mécanisme probable pour la lipolyse médiée par la TGH.
- Figure 11** Schéma de l'organisation des amorces pour le géotypage.
- Figure 12** Principe de l'interférence à l'ARN et vecteur utilisé pour la construction des plasmides siTGH.
- Figure 13** Différenciation des cellules préadipocytaires NIH 3T3-F442A.
- Figure 14** Expression de quelques protéines adipocytaires de la lipolyse au cours de la différenciation des cellules 3T3-F442A, en comparaison avec le foie et le tissu adipeux blanc (TABl).
- Figure 15** Acquisition de la fonction lipolytique et la sécrétion de la leptine par les cellules 3T3-F442A au cours de la différenciation adipocytaire.
- Figure 16** Optimisation de la concentration du ligand β 3-adrénergique, CL316,243 pour la mesure de la lipolyse dans les cellules différenciées.
- Figure 17** Optimisation de la concentration de TNF- α pour la mesure de la lipolyse dans les cellules différenciées.
- Figure 18** La lipolyse dans les adipocytes 3T3-F442A.
- Figure 19** Différenciation des fibroblastes embryonnaires normales (LHS+/+) et déficientes en lipase hormono-sensible (LHS-/-).

- Figure 20** Effet du rosiglitazone sur la différenciation et la lipolyse dans les fibroblastes embryonnaires normales (LHS+/+).
- Figure 21** Différenciation des fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/-.
- Figure 22** Expression de la LHS et de la périlipine dans les cellules fibroblastes embryonnaires après induction de leur différenciation.
- Figure 23** Activité lipolytique dans les fibroblastes embryonnaires normales (LHS+/+) et déficientes en lipase hormono-sensible (LHS-/-.).
- Figure 24** Niveaux d'adiponectine sécrétée par les fibroblastes embryonnaires normaux (LHS+/+) et déficients en lipase hormono-sensible (LHS-/-.) différenciés.
- Figure 25** Efficacité de transfection des préadipocytes NIH 3T3-F442A.
- Figure 26** Atténuation du gène de la TGH par interférence à l'ARN dans les cellules 3T3-F442A.
- Figure 27** Activité lipolytique dans les cellules 3T3-F442A différenciées normales et celles transfectées avec le vecteur pSilencer™ 3.1.hygro.siTGH2.
- Figure 28** Hypothèse actuelle quant à la lipolyse et la lipogenèse dans le tissu adipeux.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Principaux gènes impliqués dans la lipolyse adipocytaire.

Tableau II Amorces utilisées pour le génotypage

Tableau III Amorces utilisées pour la quantification de l'ARNm par PCR en temps réel.

Tableau IV Amorces utilisées lors de la construction des plasmides pour les expériences d'interférence à l'ARN.

Tableau V Niveau d'induction de l'expression de quelques gènes adipocytaires dans les cellules 3T3-F442A non différenciées (ND) et différenciées.

Tableau VI Profil d'expression d'ARNm adipocytaires dans les fibroblastes embryonnaires normaux (LHS+/+) et déficients en LHS (LHS-/-) après différenciation

Tableau VII Hypothèses et conclusions quant à l'effet de la déficience des lipases étudiées sur chacune des formes de lipolyse : basale et stimulée.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acrp30 / AdipoQ	Adiponectine
ADN	Acide desoxynucléique
ADNc	Acide desoxynucléique complémentaire
ADRP	<i>adipocyte differentiation-related protein</i> (adipophiline)
AGL	Acides gras libres
AMP	Adénosine monophosphate
Ap2	<i>Adipose tissue fatty acid binding protein</i>
ARN	Acide desoxyribonucléique
ARNm	Acide desoxyribonucléique messenger
ATGL	<i>Adipose Triglyceride Lipase</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
DEX	Dexamethasone
DG	Diglycérides
DGAT1	Diacylglycerol acyltransferase 1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
EC	Esters de cholestérol
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GK	Glycérol kinase
HDL	High density lipoprotein
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
INS	Insuline
IL-6	Interleukine-6
LDL	<i>Low density proteins</i>
LHS	Lipase hormono-sensible
LPL	Lipoprotéine lipase
MG	Monoglycérides

MGL	<i>Monoglycerides lipase</i>
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate-buffered saline Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPi	Pyrophosphate
RE	Réticulum endoplasmique
RBP4	<i>Retinol-Binding Protein 4</i>
RNAse	Ribonucléase
ROSI	Rosiglitazone
SVF	Sérum de veau fœtal
TABl	Tissu adipeux blanc
TABr	Tissu adipeux brun
TG	Triglycérides
TGH	<i>Triglyglycride hydrolase</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor- alpha</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
VLDLs	<i>Very low density lipoproteins</i>

REMERCIEMENTS :

Je dédie ce mémoire à mes très chers parents qui ont été ma source de motivation durant tout mon cheminement académique et envers qui j'exprime ma profonde gratitude. Merci à mon frère et mes sœurs pour leurs encouragements constants.

Mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, Dr. Grant Mitchell, pour son encadrement, sa disponibilité et son souci du détail qui m'ont poussée à donner le meilleur de moi-même.

Merci à toute personne qui a contribué de proche ou de loin à la réalisation de ces travaux. Un merci particulier à tous les membres du laboratoire pour leur soutien technique et leurs précieux conseils.

Une partie des travaux a été financée par la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine.

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 OBÉSITÉ ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES

L'obésité présente aujourd'hui un des plus importants problèmes de santé publique dans les pays occidentaux. Elle est souvent associée au diabète de type II ainsi qu'aux maladies cardiovasculaires telles l'hypertension et l'athérosclérose (Kershaw and Flier 2004). Chez l'enfant comme chez l'adulte, l'obésité est définie par l'excès de masse grasse corporelle. C'est entre autre la conséquence d'un défaut dans le métabolisme des acides gras (Voet and Voet 1998). La génétique, l'activité physique et l'alimentation sont parmi les facteurs importants qui entrent en jeux dans le développement de cette maladie.

Le tissu adipeux constitue notre réserve d'énergie la plus importante. Elle est dynamique et répond aux besoins de l'organisme afin de maintenir l'équilibre énergétique. Les mécanismes régulant la libération du glycérol et des acides gras du tissu adipeux (lipolyse) ne sont pas complètement connus. Le présent mémoire est consacré à la compréhension de la fonction du tissu adipeux en dehors de son interaction avec les autres organes de l'organisme. Il vise essentiellement l'étude de la régulation adipocytaire intrinsèque responsable de la dégradation des réserves de lipides à l'intérieur de l'adipocyte différencié en culture.

1.2 MÉTABOLISME DES LIPIDES

Les lipides alimentaires ingérés, majoritairement des triglycérides (TG), sont émulsifiés grâce aux acides biliaires synthétisés par le foie et sécrétés par la vésicule biliaire dans l'intestin grêle. Les micelles ainsi formées traversent alors la barrière intestinale pour être dégradées en 1,2-diacylglycérols et 2-acylglycérols par les lipases pancréatiques (Voet and Voet 1998). Les acides gras se complexent avec la protéine I-FABP (*intestinal fatty acid-binding protein*) pour pouvoir être solubilisés et transportés dans les entérocytes où ils sont ensuite reconstitués en triglycérides et

complexés sous forme de particules de chylomicrons au niveau de la membrane basale. Ces derniers sont des complexes lipoprotéiques qui transportent les triglycérides aux différents tissus via la voie sanguine (figure 1). Au niveau du foie, dans les hépatocytes, les lipides sont soit oxydés, ce qui résulte en la production de chaleur et d'ATP, ou estérifiés ce qui mène à la production de phospholipides, d'esters de cholestérol et de triglycérides. Dans le foie, les triglycérides synthétisés sont transportés sous forme de VLDLs (*very low density lipoproteins*) puis libérés dans le sang comme source d'énergie pour le muscle (Voet and Voet 1998).

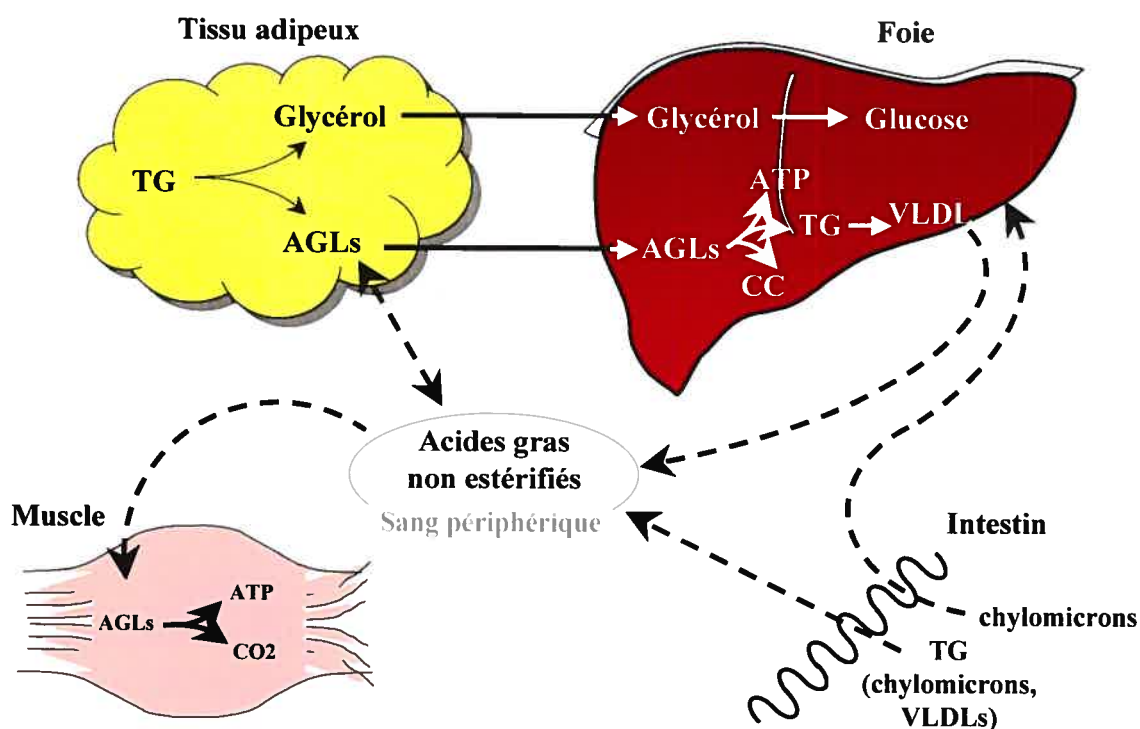


Figure 1 Rôle du tissu adipeux dans le métabolisme lipidique en relation avec quelques autres organes.

L'énergie ingérée en surplus est entreposée principalement dans le tissu adipeux. Les triglycérides transportés sous forme de chylomicrons (par absorption intestinale) ou sous forme de lipoprotéines (par synthèse hépatique) sont hydrolysés en glycérol et en acides gras libres par la lipoprotéine lipase (LPL). Dans le tissu adipeux, la LPL produite par l'adipocyte est sécrétée vers les cellules endothéliales adjacentes. Les acides gras libres ainsi libérés se rendent à l'intérieur de l'adipocyte selon le gradient de concentration par des protéines de transport transmembranaires (Voet and Voet 1998).

Une fois à l'intérieur de l'adipocyte, les acides gras entrent dans un cycle de synthèse (lipogenèse) et de dégradation des triglycérides (lipolyse) (figure 2). Les acides gras sont peu solubles dans l'eau. La grande majorité de ses molécules se trouve liée à des protéines. Dans la circulation, les acides gras sont liés à l'albumine. Dans la cellule, ils sont liés à la protéine FABP (*Fatty Acid Binding Protein*) correspondant à la protéine aP2 dans l'adipocyte. Les acides gras libres sont estérifiés par la coenzyme A par une réaction nécessitant une molécule d'ATP (figure 10). Les thioesters sont transférés au glycérol en une série d'étapes pour former les triglycérides selon un processus indépendant de l'énergie. Pour cela, le glucose est la source principale du glycérol.

Lorsque l'organisme est dans un état de besoin énergétique, comme le cas d'un jeûne, le tissu adipeux hydrolyse ses réserves de triglycérides et fournit du glycérol et des acides gras libres (AGLs) aux autres organes tels le foie, le muscle et les reins (Carmen and Victor 2005). La lipolyse consiste en l'hydrolyse des triglycérides (TG), en diglycérides (DG), en 2-monoglycérides (MG) puis en glycérol avec la libération d'un acide gras (AGL) à chaque étape (figure 2). Les acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides peuvent être réestérifiés, dégradés par bêta oxydation ou relâchés dans la circulation en tant que substrat pour le muscle et le foie (figure 1).

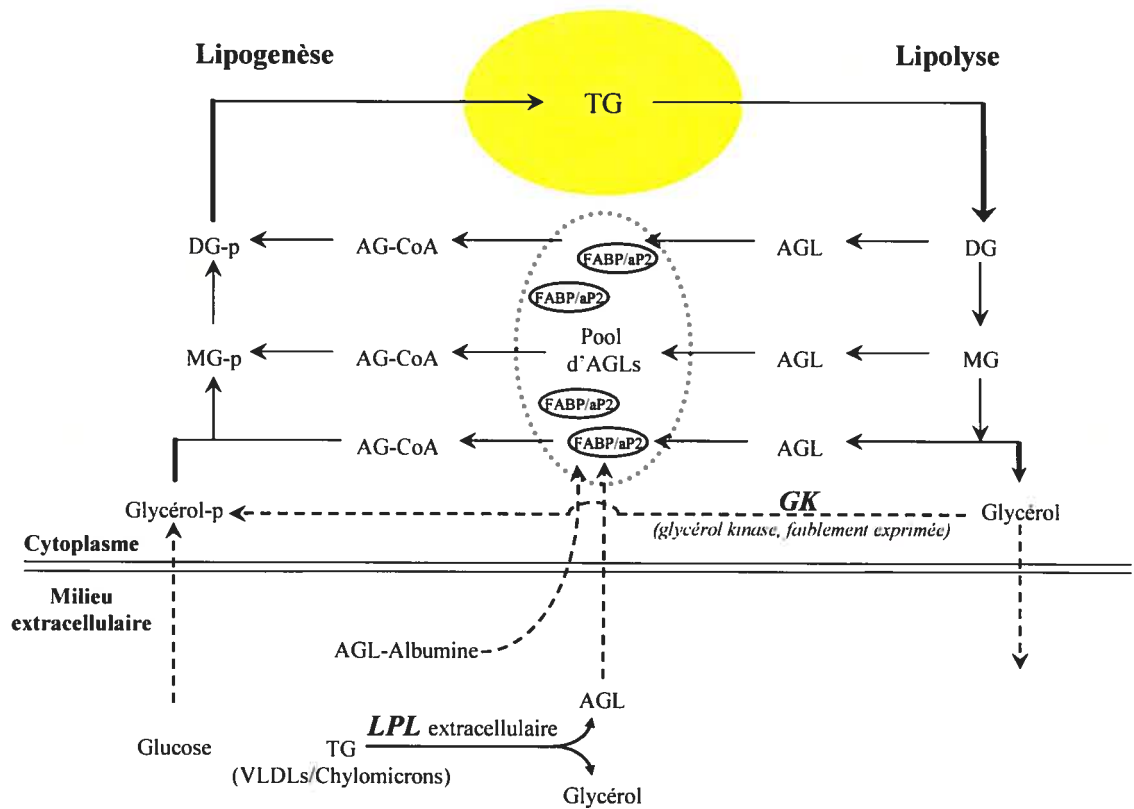


Figure 2 La lipolyse et la lipogenèse à l'intérieur de l'adipocyte. À noter qu'il y a possibilité de plusieurs cycles à l'intérieur de ce schéma. Par exemple, l'hydrolyse des TG en DG peut être suivie de la synthèse des TG à partir des DG. La réutilisation du glycérol est une voie mineure à l'intérieur de l'adipocyte. L'enzyme pouvant médier cette réaction est produite en faible quantité dans l'adipocyte. La production de glycérol représente la dégradation complète des TG et sert de mesure de la lipolyse (Reshef et al., 2003).

Le cycle des acides gras impliquant la synthèse et la dégradation peut être considéré comme futile, car il comporte un gaspillage d'énergie. L'avantage présumé de cette voie est de pouvoir maintenir une concentration optimale d'acides gras et d'intermédiaires de synthèse et de dégradation à d'autres fonctions cellulaires.

La masse adipeuse est ainsi maintenue selon un équilibre entre la production d'AGLs et leur réestérification. Des phénomènes pathologiques peuvent cependant survenir. Par exemple, une baisse de l'activité lipolytique peut conduire à une accumulation excessive de lipides dans le tissu adipeux qui peut entraîner une hausse de la concentration d'AGLs sanguins et inhiber l'utilisation du glucose musculaire (Blaak 2003).

1.3 PHYSIOLOGIE DU TISSU ADIPEUX

Le tissu adipeux existe sous deux formes : le tissu adipeux blanc (TABl) et le tissu adipeux brun (TABr). Leur distribution dans l'organisme diffère selon les espèces ainsi que leur stade de développement (Tiraby and Langin 2003). La principale fonction du TABr est la production d'énergie qui est dégagée sous forme de chaleur en réponse à des situations telle l'exposition au froid (Himms-Hagen 1990). Notons que ce type de graisse est particulièrement présent chez les petits mammifères et chez les nouveau-nés humains chez lesquels il leur assure le maintien de la température corporelle. Les coupes histologiques montrent que les adipocytes du TABr se distinguent de ceux du TABl par des inclusions lipidiques multiloculaires. De plus, le TABr est innervé et vascularisé. La thermogenèse adaptative est en effet commandée par le système nerveux central et les fibres sympathiques innervées du tissu adipeux brun (Albright and Stem 2006). La noradrénaline libérée par ces fibres se lie aux récepteurs β -adrénergiques, présents sur la surface des adipocytes bruns, et stimule la lipolyse et l'oxydation des acides gras dans les mitochondries (Ricquier and Bouillaud 2000). Fait à noter, ces dernières sont abondantes dans les adipocytes bruns

et sont riches en protéine UCP1 (*Uncoupling protein 1*). UCP1 joue le rôle d'élément découplant de la chaîne de respiration mitochondriale en permettant la dissipation du gradient de protons qui en est généré. En effet, le découplage entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP permet la libération de l'énergie sous forme de chaleur, soit la thermogenèse (Tiraby and Langin 2003).

Chez l'humain, le TABr diminue avec l'âge tandis que le TABl augmente. Ce dernier est responsable de l'entreposage de l'énergie sous forme de triglycérides (TG) lorsqu'elle se trouve en excès et de l'hydrolyse des TG lorsque l'organisme en a besoin. Bien que le TABl et le TABr aient en commun le maintien de la balance énergétique, ils réagissent différemment aux stimuli. À titre d'exemple, une diète enrichie en lipides a pour effet d'activer la thermogenèse dans le tissu adipeux brun des rats tandis que ce même traitement induit une élévation de la masse adipeuse blanche (Rothwell and Stock 1979). De plus, les souris déficientes en UCP1 démontrent une intolérance au froid, mais sont résistantes à l'obésité (Liu 2003).

1.4 MODÈLES D'ÉTUDE DU TISSU ADIPEUX

Le tissu adipeux, ayant une implication centrale dans le développement de l'obésité et des autres maladies qui lui sont associées telles le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires, il a incité beaucoup de recherche visant la compréhension des mécanismes régulateurs de l'homéostasie énergétique. Plusieurs études faites sur des modèles animaux (souris, rats, cochons, etc.) ont permis de documenter la littérature sur le développement et la physiopathologie du tissu adipeux en rapport avec ces maladies (Valet, Tavernier et al. 2002). La génération d'animaux transgéniques a également beaucoup contribué à l'avancement des connaissances. En effet, cette approche permet d'analyser spécifiquement les gènes reliés à la maladie étudiée. Par ailleurs, les modèles *in vitro* permettent de cerner et d'étudier les événements intrinsèques des adipocytes. Les adipocytes matures peuvent être isolés à partir du

tissu adipeux blanc des souris adultes, être exposés à différentes conditions expérimentales et ainsi pour étudier leur réponse indépendamment des interférences externes (ex : autres organes, environnement externe, etc.). D'autres études se sont servies du modèle de culture primaire de préadipocytes isolés de diverses espèces incluant la souris et l'humain et leur différenciation en adipocytes et ont ainsi permis l'étude de leur réponse adipocytaire dans un contexte isolé des interférences externes (Gregoire, Smas et al. 1998).

Au laboratoire d'accueil, le modèle animal, l'adipocyte isolé et les essais *in vitro* sont étudiés de façon routinière. Le projet de maîtrise présenté ici, apporte un outil d'étude complémentaire : l'adipocyte différencié en culture.

Les préadipocytes soumis à un cocktail de facteurs approprié qui induit l'adipogenèse et l'acquisition des propriétés morphologiques et moléculaires des adipocytes matures. Ce mélange est habituellement composé du 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), un inhibiteur de la phosphodiesterase; du dexaméthasone (DEX), un glucocorticoïde synthétique, et de l'insuline (Alexander, Ganem et al. 1998). Les fibroblastes préparés à partir d'embryons de souris de 13,5 à 19 jours de gestation répondent également à ce cocktail inducteur et se différencient en adipocytes matures (Harvey, Sands et al. 1993). D'autre part, il existe des lignées préadipocytaires immortalisées prédisposées à cette transformation et qui se différencient donc plus aisément et plus rapidement. Les lignées les plus fréquemment utilisées sont les préadipocytes 3T3-L1 et 3T3-F442A. Il s'agit de clones isolés à partir de cellules issues d'embryons de souris *Swiss*, prélevés après 17 à 19 jours de gestation (Green and Kehinde 1975). La lignée 3T3-C2 provient de la même origine, mais ne se différencie pas naturellement en adipocytes et elle est donc utilisée comme contrôle dans le but d'étudier les marqueurs et régulateurs de la différenciation adipocytaire (Knutson 1992). Il existe également d'autres lignées préadipocytaires pouvant être différenciées sous des conditions hormonales appropriées telles les CH3 10T1/2 (embryons de souris) (Konieczny and Emerson 1984), les Ob17 (tissu adipeux

épididymal de souris *ob/ob* adulte) (Gharbi-Chichi, Grimaldi et al. 1981) et les cellules ES (Dani, Smith et al. 1997).

1.5 RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE L'ADIPOGÈNESE

Les événements moléculaires responsables du processus de détermination des cellules pluripotentes en cellules préadipocytaires restent encore à élucider (Gregoire, Smas et al. 1998; Rangwala and Lazar 2000). En réponse au cocktail hormonal inducteur de la différenciation composé du DEX, IBMX et INS, les cellules échappent au cycle cellulaire après s'être divisées au moins une fois pour entrer en adipogenèse (figure 3) (Tang et al. 2003). La différenciation adipocytaire est un processus séquentiel au cours duquel les cellules expriment des transcrits et des protéines spécifiques pour chacune des étapes de différenciation, tel que schématisées sur la figure 4. Durant cette conversion, les cellules acquièrent les propriétés phénotypiques et moléculaires caractéristiques des adipocytes matures (Gregoire 2001).

L'arrêt de croissance a lieu lorsque les cellules sont confluentes (figure 3). Les cellules restent alors en phase G_0/G_1 du cycle cellulaire et le programme d'adipogenèse est alors initié. En réponse au stimulus hormonal, il y a expansion

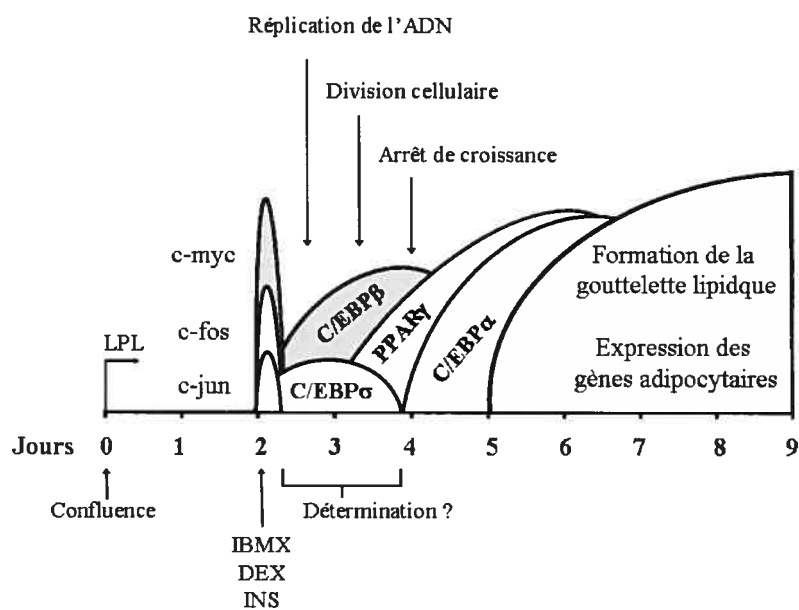


Figure 3 Évolution de la transcription des gènes adipocytaires suite à l'induction de la différenciation des cellules par l'ajout du IBMX, du dexaméthasone et de l'insuline. Adaptée de (Ntambi and Young-Cheul 2000).

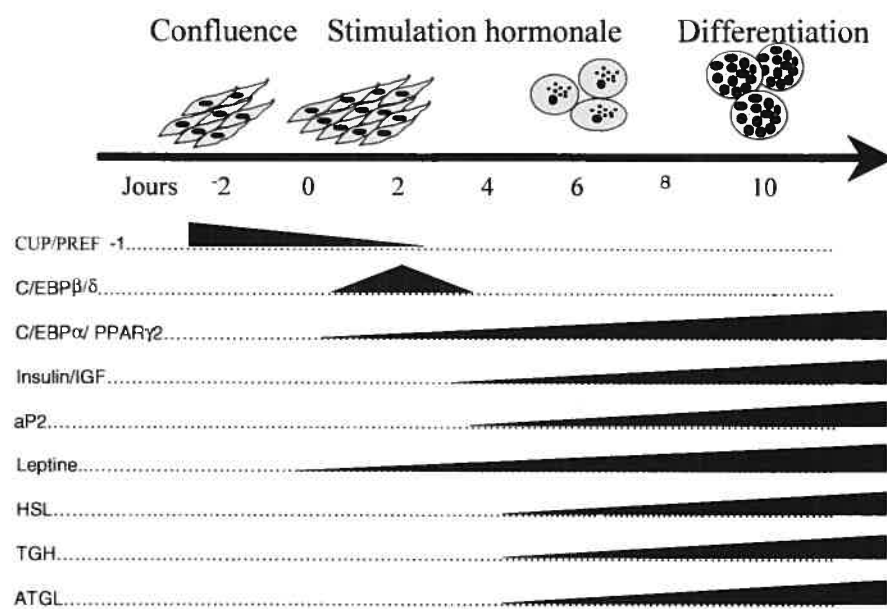


Figure 4 **Différenciation adipocytaire.** Les transcrits adipocytaires sont induits en réponse à l'induction de la différenciation.

clonale durant laquelle les cellules passent en phase S du cycle cellulaire et où elles subissent un ou deux tours de mitose. Cette étape est caractérisée par l'expression des facteurs de transcription C/EBP β et C/EBP δ . La phase terminale, quant à elle, se caractérise par l'expression des facteurs PPAR γ et C/EBP α , entre autres. Les cellules acquièrent alors les propriétés phénotypiques et moléculaires des adipocytes matures (Gregoire, Smas et al. 1998) (Rangwala and Lazar 2000).

1.10.1 PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)

Le facteur de transcription PPAR γ a été identifié par Tontonoz et *al.* suite à l'analyse du complexe ARF6 (*adipocyte regulatory factor 6*) qui lie le promoteur spécifiquement adipocytaire, aP2 (*adipocyte promoter 2*) (Tontonoz, Graves et al. 1994). PPAR γ fait partie de la famille des récepteurs nucléaires de type II qui comprennent également PPAR α et PPAR β/δ qui s'hétérodimérisent avec les récepteurs RXRs. Deux isoformes ont fait l'objet de nombreuses études : PPAR γ 1 et PPAR γ 2. Ce dernier est spécifique au tissu adipeux où son expression est prédominante. Une nouvelle forme, PPAR γ 3, a été récemment identifiée et qui semble également être impliquée dans le développement du tissu adipeux. Il s'agit d'une séquence protéique identique à celle de PPAR γ 1 (même gène), mais issue d'un promoteur différent (Fajas, Fruchart et al. 1998). De nombreuses études ont montré que le facteur de transcription PPAR γ est l'un des éléments déterminants dans le déclenchement du processus d'adipogenèse. Non seulement son niveau d'expression est-il élevé dans les adipocytes, mais PPAR γ est en soi suffisant pour induire l'arrêt de la croissance cellulaire et l'entrée en adipogenèse (Gregoire, Smas et al. 1998). En effet, l'adipogenèse peut être enclenchée dans les cellules fibroblastes et cellules musculaires par expression ectopique de PPAR γ , ce qui suggère son rôle critique dans le développement du tissu adipeux (Gregoire, Smas et al. 1998).

Différents ligands naturels ou synthétiques ont été identifiés pour PPAR γ . Il s'agit de molécules lipophiles telles les acides gras libres et dérivés comme la prostaglandine 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (Forman, Tontonoz et al. 1995; Brun, Kim et al. 1996; Brun, Tontonoz et al. 1996). Les ligands des récepteurs RXR α , tels le LG100268, ont également un effet inducteur de la différenciation adipocytaire dans les cellules 3T3-L1 et montrent un effet synergique avec les ligands de PPAR γ (Schulman, Shao et al. 1998). Par ailleurs, les agents antidiabétiques thiazolidinediones (TZDs) sont des ligands connus pour induire une haute réponse de l'activité de PPAR γ (Henry 1997). Le troglitazone (Resulin[®]), le rosiglitazone (Avandia[®]) et le pioglitazone (Actos[®]) en sont des exemples. Ces composés peuvent améliorer la résistance à l'insuline chez les patients atteints de diabète de type II. Leur pouvoir activateur du facteur de transcription PPAR γ corrèle avec leur capacité à induire la différenciation adipocytaire (Gregoire, Smas et al. 1998). D'ailleurs, le rosiglitazone est utilisé dans quelques publications pour différencier les cellules fibroblastes en adipocytes (Gregoire, Smas et al. 1998). Ceci met en évidence l'étroite relation entre les facteurs de différenciation adipocytaire et la résistance à l'insuline (Picard and Auwerx 2002).

Le rôle des autres isoformes des récepteurs PPAR dans l'adipogenèse n'est pas encore bien documenté. Toutefois, il est connu que PPAR α , bien que très peu exprimé dans l'adipocyte, est capable d'induire la différenciation adipocytaire en présence de forts activateurs de sa transcription (Brun, Tontonoz et al. 1996). PPAR α est plutôt prédominant dans le foie où il stimule le catabolisme des acides gras (Desvergne and Wahli 1999). PPAR δ , quant à lui, est fortement exprimé durant les stades précoces de la différenciation adipocytaire. Des études ont montré qu'en présence de ses ligands spécifiques, PPAR δ n'est pas adipogénique. Par ailleurs, lorsque PPAR δ est exprimé de façon ectopique dans les cellules 3T3-C2 et mis en présence de ligands de PPAR γ , il y a accumulation de lipides dans ces cellules (Bastie, Holst et al. 1999).

PPAR γ est régulé post-transcriptionnellement par la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Adams, Reginato et al. 1997). L'activation de la MAPK par EGF entraîne la phosphorylation de PPAR γ , ce qui empêche la différenciation adipocytaire (Adams, Reginato et al. 1997; Camp and Tafuri 1997).

Divers facteurs protéiques ont été identifiés comme étant des co-activateurs des récepteurs PPAR γ . SRC-1/NcoA-1/ERAP160, GRIP-1/TIF-2/SRC-2, pCIP/ACTR/RAC-3/AIB-1/TRAM-1/SRC-3, CBP/p300 et les PPAR-*binding proteins* en sont des exemples. Ces molécules lient le récepteur PPAR γ pour induire son activation et enclencher le processus de transcription des gènes adipocytaires (Schulman, Shao et al. 1998).

PGC-1 (*PPAR gamma coactivator 1*) est un autre coactivateur du récepteur PPAR γ . Il fait l'objet d'un intérêt particulier étant donné son implication dans la régulation de la thermogenèse. En effet, PGC-1 est prédominant dans le tissu adipeux brun où son expression est induite en réponse à une baisse de la température corporelle (Wu, Puigserver et al. 1999). Le rôle de PGC-1 dans le métabolisme énergétique fait également l'objet des études sur le tissu adipeux blanc. PGC-1 α induit l'activation du promoteur UCP1 (*uncoupling protein 1*) par PPAR γ . Dans les adipocytes provenant du tissu adipeux blanc subcutané, la surexpression de PGC-1 α humain augmente l'expression de UCP1, des protéines de la chaîne de respiration ainsi que celle des enzymes de l'oxydation des acides gras (Tiraby, Tavernier et al. 2003). Ces données montrent la capacité de PGC-1 à pouvoir diriger la transcription vers des mécanismes de dissipation de l'énergie.

L'ablation de PPAR γ chez les souris est létale dû à un défaut du placenta (Barak, Nelson et al. 1999). Les souris transgéniques PPAR γ ^{-/-} ayant un placenta de type sauvage survivent, mais elles sont dépourvues de tissu adipeux blanc, ce qui

démontre l'importance du facteur de transcription PPAR γ dans le développement du TABI (Barak, Nelson et al. 1999).

1.10.1 C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein)

C/EBP est un facteur de transcription à domaine bZIP (*basic leucine zipper*)⁷, induit par le cocktail de différenciation (IBMX, DEX, INS). Parmi les six membres identifiés de la famille de C/EBP, le tissu adipeux exprime C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ et C/EBP ζ . Ces isoformes sont exprimés à différentes étapes de l'adipogenèse. Par exemple, C/EBP β et C/EBP δ sont exprimés durant la phase précoce en réponse aux stimulants hormonaux. C/EBP α est exprimé vers la fin de la différenciation adipocytaire suite à l'expression de divers gènes marqueurs tels GLUT-4, PEPCK (*Phospho-enol-pyruvate carboxykinase*) et UCP (Darlington, Ross et al. 1998). Ce délai d'expression est entre autres dû à la présence de facteurs répresseurs tels AP-2 α comme démontré dans les préadipocytes 3T3-L1 (Jiang, Tang et al. 1998). La surexpression de l'isoforme C/EBP β dans les préadipocytes 3T3-L1 entraîne ces cellules en adipogenèse, et ce, même en absence du mélange d'induction (Yeh, Cao et al. 1995). C/EBP ζ , quant à lui, s'hétérodimérise avec les autres formes de C/EBP et joue le rôle d'inhibiteur dominant négatif durant l'adipogenèse (Rangwala and Lazar 2000). Les isoformes C/EBPs sont régulés par phosphorylation. Par exemple, C/EBP α est phosphorylé par la protéine GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*), ce qui bloque l'adipogenèse. L'insuline inhibe l'activité de la GSK-3 ce qui induit la déphosphorylation de C/EBP α (Ross, Erickson et al. 1999).

Les souris C/EBP $^{-/-}$ meurent d'hypoglycémie 8 heures après leur naissance (Wang et al. 1995). Les hépatocytes ainsi que les adipocytes de ces souris C/EBP $^{-/-}$ n'accumulent pas les lipides. Ces observations supportent le rôle important du facteur C/EBP dans la maintenance de l'homéostasie énergétique chez les nouveau-nés.

1.10.2 *ADD1/SREBP*

ADD1 (Adipose Differentiation et Determination factor) dont l'homologue est *SREBP (Sterol Regulatory Binding Protein)* chez l'humain est un facteur de transcription à domaine de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) zipper de leucine. Il en existe deux formes : *SREBP-1a* et *SREBP-1c* (Rangwala and Lazar 2000). Ce facteur de transcription est connu comme étant régulateur de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras (Brown and Goldstein 1997). En absence de cholestérol, *ADD1* est protéolysé et relâché dans le cytosol pour entrer dans le noyau et induire la transcription de gènes spécifiques (Wang, Sato et al. 1994).

Les études portant sur le facteur *ADD1/SREBP-1c* suggèrent que ce facteur régulerait le métabolisme énergétique en régulant l'action de l'insuline sur l'expression des gènes adipocytaires. *ADD1/SREBP-1c* influencerait l'action de l'insuline par l'intermédiaire de *PPAR γ* . L'insuline, à son tour, agirait via ces récepteurs pour induire la transcription du facteur *ADD1/SREBP-1c* (Flier et al. 1999).

1.6 LE TISSU ADIPEUX EN TANT QU'ORGANE ENDOCRINE

La dynamique du tissu adipeux est régulée par des stimuli hormonaux, neuronaux et nutritionnels qui permettent le maintien de la balance énergétique (Ritchie, Ewart et al. 2004). Par ces signaux, les adipocytes répondent en hydrolysant les réserves de triglycérides (lipolyse) lorsqu'il y a besoin énergétique et en les stockant lorsque l'énergie se trouve en excès. Par ailleurs, le tissu adipeux est lui-même un organe producteur de signaux hormonaux (Gregoire, Smas et al. 1998). Plusieurs études ont démontré que les cellules adipocytaires matures sécrètent des facteurs hormonaux (adipocytokines ou adipokines) qui sont impliqués non seulement dans la régulation du poids corporel, mais également dans l'inflammation et la réponse immunitaire

ainsi que les maladies cardiovasculaires (Gregoire, Smas et al. 1998; Lau, Dhillon et al. 2005). Ces adipocytokines jouent un rôle déterminant dans l'homéostasie énergétique de l'organisme et sont par conséquent impliquées dans les maladies métaboliques, telles l'obésité et la résistance à l'insuline. Il y a de plus en plus d'évidences que les adipocytokines sont un lien majeur entre l'obésité et ces autres maladies.

1.6.1 Leptine

La leptine est une cytokine qui a été identifiée pour la première fois par clonage positionnel comme issue du gène *Ob* (*obese*), impliqué dans la régulation de la balance énergétique (Zhang, Proenca et al. 1994). La leptine est produite et sécrétée par les adipocytes pour être acheminée vers les récepteurs membranaires de cellules cibles via la voie sanguine. Les récepteurs de la leptine sont majoritairement présents au niveau de l'hypothalamus. Le rôle physiologique de la leptine principal est d'informer le cerveau de l'état des réserves énergétiques (Baudin 2000). Cette adipocytokine permettrait ainsi au métabolisme d'être couplé au comportement nutritionnel (Ahima and Flier 2000). Six formes du récepteur de la leptine ont été identifiées dont le mieux caractérisé est Ob/Rb (Zabeau, Lavens et al. 2003). Des études effectuées chez les rongeurs comme chez l'humain ont démontré que des mutations génétiques ou des défauts au niveau du gène *Ob* de la leptine induisent l'hyperphagie et l'obésité (Montague, Farooqi et al. 1997; Strobel, Issad et al. 1998). De plus, le traitement avec la leptine recombinante atténue l'hyperphagie et induit la perte de poids chez les sujets ayant une déficience génétique en cette hormone (Farooqi, Matarese et al. 2002). L'expression de la leptine est proportionnelle à la masse adipeuse. Cependant, bien que les niveaux de leptine soient élevés chez les individus obèses, l'effet de cette hormone de satiété n'est pas ou est très peu observé. Dans ces cas (obésité exogène), il existe plutôt un phénomène de « résistance à la leptine » (Bjorbaek, El-Hashimi et al. 1999).

1.6.2 Adiponectine

L'adiponectine, aussi appelée AdipoQ ou Acrp30, est également une hormone produite et sécrétée par les adipocytes. Contrairement à la leptine, les niveaux d'expression de l'adiponectine sont inversement proportionnels à la masse adipeuse (Arita, Kihara et al. 1999). Le rôle bénéfique de l'adiponectine dans le problème de résistance à l'insuline a été mis en évidence par plusieurs études. Chez les rongeurs, l'injection de l'adiponectine stimule l'oxydation des acides gras non estérifiés, ce qui a pour effet une diminution des niveaux de glucose dans le sang (Hoffstedt, Arvidsson et al. 2004). À plus long terme, l'administration de l'adiponectine diminue les réserves de triglycérides dans le foie et le muscle (Hoffstedt, Arvidsson et al. 2004). Deux récepteurs ont été identifiés pour l'adiponectine, soit le récepteur AdipoR1 qui est prédominant dans le muscle squelettique, et AdipoR2, exprimé majoritairement dans le foie (Yamauchi, Kamon et al. 2003).

1.6.3 $TNF-\alpha$

$TNF-\alpha$ est une cytokine pro-inflammatoire. Son taux de sécrétion est élevé dans le tissu adipeux et corrèle avec l'indice de masse corporelle et la résistance à l'insuline (Lau, Dhillon et al. 2005). $TNF-\alpha$ est impliqué dans la croissance, la différenciation et la fonction d'une large variété de types cellulaires et agit par affinité aux récepteurs membranaires TNFR1 et TNFR2 (Sethi and Hotamisligil 1999). Des études ont rapporté l'implication de ces récepteurs dans l'activation de plusieurs protéines kinases et phosphoprotéines phosphatases (Rydén, Dicker et al. 2002). Les mécanismes par lesquels le $TNF-\alpha$ augmente la résistance à l'insuline sont encore très peu caractérisés. Des études ont rapporté l'induction de la relâche des acides gras libres par le $TNF-\alpha$ dans les adipocytes (Green, Dobias et al. 1994). Il agirait également par la réduction de la synthèse de l'adiponectine, ainsi que par la suppression des signaux de l'insuline (Pittas, Joseph et al. 2004).

1.6.4 IL-6

L'interleukine 6 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par divers types cellulaires dont les cellules du système immunitaire, les fibroblastes, les cellules endothéliales ainsi que le muscle squelettique (Pittas, Joseph et al. 2004). Dans le tissu adipeux humain, 90 % de l'expression de l'IL-6 provient du stroma (Fried et al. 1998). Les niveaux plasmatiques de l'IL-6 corrélaient avec l'obésité et la résistance à l'insuline (Vozarova, Weyer et al. 2001). Chez l'humain, l'administration de l'IL-6 résulte en l'augmentation dose-dépendante du glucose sanguin (Tsigos, Papanicolaou et al. 1997). De plus, les études génétiques ont révélé une forte corrélation entre la résistance à l'insuline et le polymorphisme du gène IL-6 (Vozarova, M. et al. 2003). Des études ont rapporté que, tout comme le TNF- α , l'IL-6 induit la relâche d'acides gras libres par le tissu adipeux et réduit la synthèse de l'adiponectine (Pittas, Joseph et al. 2004). Par ailleurs, les souris déficientes en IL-6 ne sont protégées ni du développement de l'obésité ni de la résistance à l'insuline (Wallenius, Wallenius et al. 2002).

1.6.5 Visfatine

La visfatine a été identifiée par analyse différentielle de l'expression génique comme étant abondante dans le tissu adipeux humain viscéral et subcutané (Fukuhara, Matsuda et al. 2005). Elle est identique à PBEF (*B cell colony-enhancing factor*), sécrétée par les cellules immunitaires B, (Samal, Sun et al. 1994). La visfatine diminue le niveau sanguin du glucose chez les souris. Elle stimule l'accumulation des triglycérides ainsi que la différenciation adipocytaire. De plus, les études ont révélé que la visfatine lie le récepteur de l'insuline et active ses second messagers, selon toutefois un mécanisme différent de l'insuline (Fukuhara, Matsuda et al. 2005).

Les niveaux plasmatiques de la visfatine augmentent suite à une diète riche en gras (Sethi et al. 2005). Ceci suggère un rôle important de la visfatine dans la résistance à l'insuline induite par la diète ou l'obésité.

1.6.6 RBP4 (*Retinol-binding protein 4*)

La protéine RBP4 est sécrétée par l'adipocyte et semble pouvoir réguler les mécanismes d'action de l'insuline dans le développement du diabète de type II. La résistance à l'insuline dans le tissu adipeux est associée à une baisse des niveaux de Glut4 (*Glucose transporter 4*). Ceci résulte en une surproduction de la protéine RBP4 qui conduit à une élévation de l'enzyme PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase) et de la gluconéogenèse dans le foie ainsi qu'une surproduction du glucose (Polonsky 2006). Graham et al. ont rapporté une corrélation entre les niveaux de RBP4 dans le sérum avec le degré de résistance à l'insuline chez les individus obèses et diabétiques de type II. Ces auteurs ont également observé cette corrélation chez les personnes non-obèses et non-diabétiques avec une forte histoire familiale de diabète de type II. Les hauts niveaux de RBP4 sanguins sont également associés avec un haut indice de masse corporelle, des hauts niveaux de TG et une baisse des niveaux de HDL (*high density lipoprotein*) (Graham, Yang et al. 2006). Yang et al. ont rapporté que les niveaux d'expression de RBP4 peuvent être normalisés à l'aide du rosiglitazone (Yang et al. 2005). La surexpression de la RBP4 humaine ou l'injection de la protéine recombinante chez les souris normales cause la résistance à l'insuline. Par ailleurs, la délétion de la protéine RBP4 améliore la sensibilité à l'insuline. Malgré que ces données démontrent l'implication de RBP4 dans le développement du diabète de type II, les mécanismes par lesquels cette protéine agit restent à déterminer.

1.7 L'ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE ADIPOCYTAIRE

Les triglycérides (TG) sont entreposés dans des gouttelettes lipidiques à l'intérieur des adipocytes. Dans les modèles *in vitro*, comme les 3T3-L1 et 3T3-F442A, on retrouve plusieurs gouttelettes de taille plus ou moins hétérogène. Les cellules du tissu adipeux blanc des mammifères renferment plutôt une large et unique vacuole pouvant atteindre jusqu'à 95 % du volume adipocytaire (Carmen and Victor 2005). Lorsque l'organisme est en besoin énergétique, comme le cas d'un jeûne par exemple, le tissu adipeux hydrolyse ces réserves de triglycérides et fournit du glycérol et des acides gras libres (AGLs) aux autres organes tels le foie, le muscle et les reins (Carmen and Victor 2005). Pour cela, une série de gènes sont impliqués dans ce processus (tableau 1).

La lipase hormono-sensible (LHS) était auparavant la seule lipase connue qui soit capable d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides dans le tissu adipeux. Au laboratoire d'accueil, Dr. Shu Pei Wang a généré des souris invalidées pour le gène de la LHS (souris LHS^{-/-}) (Wang, Laurin et al. 2001). Contrairement aux attentes, ces souris ont un poids corporel normal et même une baisse de la masse adipeuse. Chez ces souris, nous avons détecté un niveau basal lipolytique qui s'est maintenu malgré l'absence de la LHS. Ces observations ont permis de constater l'existence d'une ou de plusieurs lipases non-LHS qui soient capables d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides. Au laboratoire, Dr. K. Soni a identifié la lipase TGH (carboxylesterase 3) (Soni, Lehner et al. 2004). Plus tard, Zimmermann et al. ont identifié une autre lipase candidate, l'ATGL (*adipose triglyceride lipase*) (Zimmermann, Strauss et al. 2004).

Protéine	Classification enzymatique	Position dans le génome humain	Position dans le génome murin
Lipases			
LHS	EC 3.1.1.79	19q13.2	7qA3
TGH	EC 3.1.1.1	16q12.2	8qC5
ATGL	EC 3.1.1.3	11p15.5	7qF5
MGL	EC 3.1.1.23	3q21.3	6qD1
Protéines de la gouttelette			
Périlipine	-	15q26.1	7qD2
Adipophiline (ADRP)	-	9q22.1	7qC4
Ap2/FABP	-	8q21.13	3qA1
Lipogenèse			
PEPCK	EC 4.1.1.32	14q12	14qC2
DGAT1	EC 2.3.1.20	8q24.3	15qD3
Signalisation			
Récepteur β_3 -adrénergique	-	8p12	8qA2
PKA	EC 2.7.1.37	19p13.12	8qC3
AMPK	EC 2.7.1.37	1q32.2	4qC6

Tableau I Principaux gènes impliqués dans la lipolyse adipocytaire.

1.8 LA LIPASE HORMONO-SENSIBLE (LHS) :

1.8.1 *Propriétés structurales et enzymatiques*

La lipase hormono-sensible (LHS, EC 3.1.1.3) est exprimée dans plusieurs types de tissus où elle possède une large spécificité de substrat et joue divers rôles dans le métabolisme lipidique. En plus des acylglycérides TG, DG et MG, la LHS hydrolyse les esters de cholestérol, les esters d'acide rétinoïque, les esters d'hormones stéroïdiennes et les esters *p*-nitrophenyliques. Toutefois, l'enzyme est dépourvue d'activité de phospholipase (Holm, Osterlund et al. 2000). L'affinité de la LHS pour les DG est plus élevée que pour les TG et MG de 10 à 12 fois et de 5 à 10 fois, respectivement (Fredrikson and Belfrage 1983).

Le gène humain de la lipase hormono-sensible est situé sur le chromosome 19q13.2 tandis que celui de la souris est sur le chromosome 7 (tableau 2). Jusqu'à présent, trois isoformes ont été identifiés pour la LHS. Leur poids moléculaire s'étale de 84 à 130 kDa. Ils sont issus du même gène, mais transcrits à partir de différents promoteurs. Deux promoteurs ont été identifiés et caractérisés : le promoteur en amont de l'exon B et celui en amont de l'exon T. Le premier semble être fonctionnel dans le tissu adipeux ainsi que dans les autres tissus, tandis que celui en amont de l'exon T est spécifique aux testicules (Holm 2003).

La séquence de la LHS est constituée de 9 exons (figure 5). Les études effectuées sur l'isoforme adipocytaire ont permis de constater que la LHS est constituée de deux domaines structuraux majeurs. L'un des deux est un domaine N-terminal, variable entre les isoformes, qui serait impliqué dans les interactions protéine-protéine et protéine-lipides. Ce domaine LHS serait responsable de l'interaction de cette lipase avec les protéines transportatrices d'AGLs intracellulaires, FABPs (*fatty acid-binding proteins*) (Jenkins-Kruchten, Bennaars-Eiden et al. 2003).

La structure C-terminale catalytique constitue l'autre domaine structural majeur de la LHS. Chez la souris, cette séquence C-terminale contient la triade catalytique qui consiste en trois résidus impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme : Ser423, Asp694 et His724. De plus, elle renferme une structure régulatrice contenant les sites de phosphorylation Ser557, Ser559, Ser650 et Ser651 (Fredrikson and Belfrage 1983; Holm 2003; Yeaman 2004).

1.8.2 Profil d'expression et rôles tissulaires de la LHS :

La lipase hormono-sensible est exprimée dans le tissu adipeux, les tissus stéroïdogéniques, les glandes mammaires, le muscle, les macrophages et le pancréas (Holm, Osterlund et al. 2000).

La LHS dans le tissu adipeux :

La lipase hormono-sensible est principalement connue dans le tissu adipeux blanc pour sa capacité à hydrolyser les lipides entreposés (Osterlund 2001). Au laboratoire, Wang S. et al. ont généré des souris constitutivement déficientes en cette lipase (Wang, Laurin et al. 2001). Ces souris LHS $-/-$, chez lesquelles aucun peptide LHS ni activité cholesteryl estérase ne sont détectables dans leur tissu adipeux blanc, ont un poids corporel normal, mais une masse de gras abdominal réduite par rapport aux souris contrôles, LHS $+/+$. Dans le tissu adipeux blanc comme dans le brun des souris LHS $-/-$, les analyses histologiques ont révélé une hétérogénéité dans la taille cellulaire où des cellules de tailles normales étaient juxtaposées à des adipocytes plus larges. Les mesures de lipolyse dans les adipocytes isolés à partir des souris LHS $-/-$ ont montré une atténuation de la réponse β_3 -adrénergique. Ceci met en évidence l'implication des signaux β_3 -adrénergiques dans la cascade d'activation de la lipase hormono-sensible. Par ailleurs, un niveau basal d'activité lipolytique est tout de même maintenu en absence de stimulation β_3 -adrénergique, malgré la déficience en LHS.

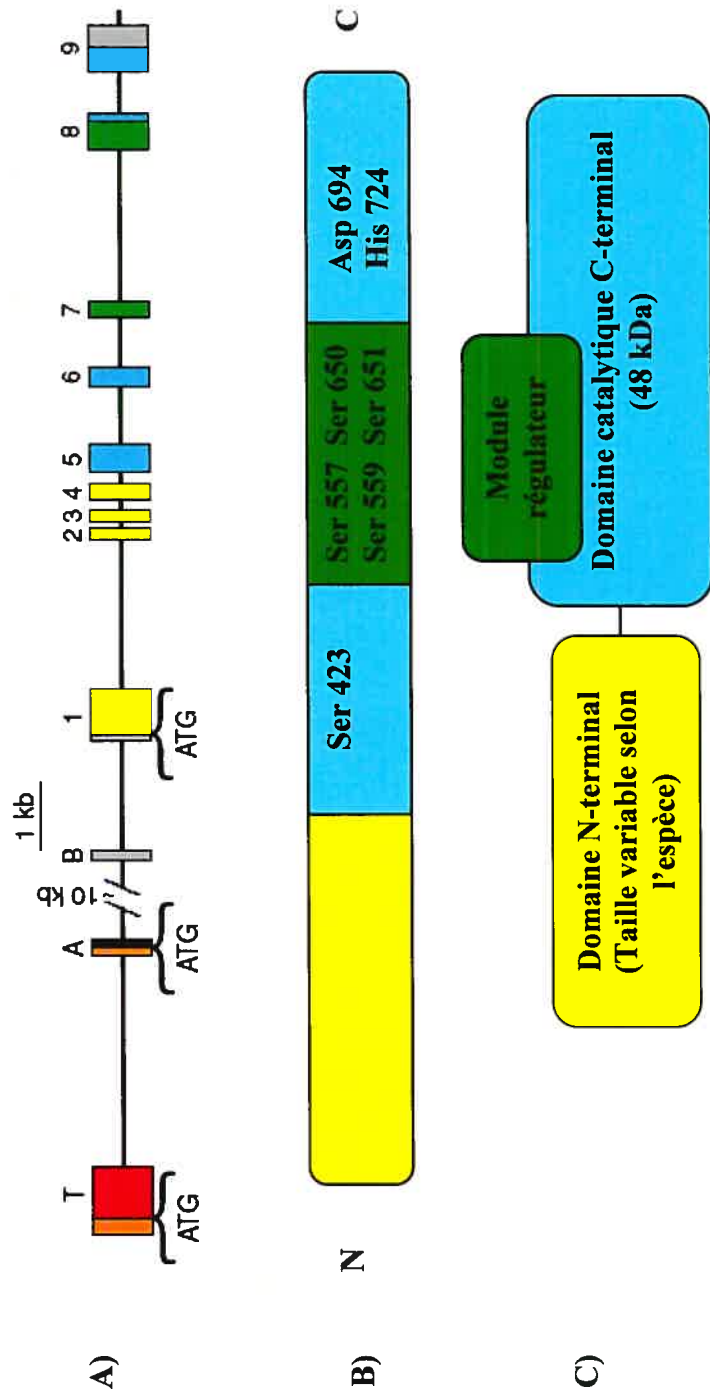


Figure 5 Structure du gène de la LHS de souris et de la protéine correspondante. A) Organisation des exons et introns du gène. B) Représentation linéaire de la séquence d'acides aminés de la protéine. C) Schématisation des domaines protéiques structuraux. Adaptée de Holm, 2003.

Ceci démontre l'existence d'une ou de plusieurs autres lipases dans le tissu adipeux blanc qui soient capables d'hydrolyser les lipides selon un mécanisme indépendant des récepteurs β_3 -adrénergiques. Les adipocytes déficients en LHS ont également démontré une accumulation des diglycérides (DG) mettant ainsi en évidence une plus haute affinité de la LHS pour les DG (Wang, Laurin et al. 2001). Les études qui ont suivies au laboratoire, ont démontré que l'expression de la forme humaine de la LHS chez ces souris LHS^{-/-} corrigeait leur tissu adipeux blanc morphologiquement, biochimiquement et physiologiquement (Fortier, Soni et al. 2005).

Dans le tissu adipeux brun, les acides gras libres issus de l'hydrolyse des TG par la LHS sont à la fois utilisés comme substrats et activateurs physiologiques des protéines de découplage lors de la thermogenèse sans frisson. L'activité enzymatique de la LHS étant maintenue même à basses températures, son rôle serait critique dans le métabolisme énergétique des animaux en hibernation (Langin, Laurell et al. 1993). Le tissu adipeux brun des souris invalidées pour le gène de la LHS est hypertrophié, mais les souris sont tolérantes au froid (Wang, Laurin et al. 2001).

La LHS dans les glandes surrénales :

Dans les glandes surrénales, la lipase hormono-sensible joue un rôle dans la stéroïdogenèse. Elle fournirait le cholestérol libre pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Holm, Kirchgessner et al. 1988). De plus, ces dernières étant entreposées dans les cellules sous forme d'esters d'acides gras, la LHS serait l'enzyme estérase impliquée dans l'hydrolyse de ces esters (Holm, Osterlund et al. 2000). Dans les glandes surrénales, la LHS comble la fonction cholestérol-estérase pour fournir du cholestérol libre essentiel à la stéroïdogenèse (Cook, Yeaman et al. 1982). L'invalidation des souris en LHS, entraîne une accumulation de gouttelettes lipidiques dans ces glandes. Ceci donne lieu à une moindre sécrétion de corticostérone en réponse à une stimulation aiguë à l'ACTH (Li, Brochu et al. 2002).

La présence de cette réponse en dépit de l'absence de la LHS démontre toutefois l'existence de voies alternatives qui seraient LHS-indépendantes.

La LHS dans les testicules :

Dans la spermatogenèse, la LHS joue un rôle critique étant donné que l'invalidation des souris en LHS cause la stérilité chez ces animaux mâles (Osuga, Ishibashi et al. 2000; Wang, Chung et al. 2004). Au laboratoire, Wang et al. ont généré des souris transgéniques exprimant l'isoforme testiculaire du cDNA de la LHS spécifiquement dans les cellules germinales post-mitotiques. Ceci a permis le rétablissement de la fertilité chez les souris ce qui démontre l'importance de cette lipase dans ces cellules (Wang, Chung et al. 2004).

La LHS dans le pancréas :

La LHS est exprimée dans les cellules bêta pancréatiques. Sous des conditions normales, les souris LHS^{-/-} ont des taux de glucose et d'insuline normaux. Par ailleurs, en réponse à un jeûne de 12 h, les niveaux d'acides gras libres sanguins sont réduits d'environ 30 % chez ces souris par rapport aux souris témoins, LHS^{+/+} (Roduit, Masiello et al. 2001). Ceci supporte l'idée que la LHS soit impliquée dans la génération de dérivés lipidiques servants de signaux reliant la capacité sécrétrice de ces cellules à l'obésité et au diabète de type II.

La LHS dans les macrophages :

Le rôle de la LHS dans les macrophages est incertain. La formation des esters de cholestérol dans les macrophages est un mécanisme de défense contre l'élévation des niveaux de cholestérol libre intracellulaire. Les macrophages engorgés de lipides

deviennent des cellules spumeuses et sont responsables du développement de l'athérosclérose. La LHS jouerait un rôle dans la prévention de la progression de l'athérosclérose par la réduction des esters de cholestérol présents dans les cellules spumeuses (Holm, Osterlund et al. 2000). Ceci a été démontré en culture (Escary, Choy et al. 1998), mais est paradoxal avec les résultats obtenus *in vivo*. En effet, les souris transgéniques surexprimant la LHS dans les macrophages souffrent de lésions athérosclérotiques accélérées (Escary, Choy et al. 1999).

La LHS dans le muscle :

La LHS est exprimée dans les fibres musculaires cardiaques et squelettiques (Holm, Kirchgessner et al. 1988). Les triglycérides entreposés dans le cytoplasme des myocytes sont hydrolysés en réponse aux catécholamines et à l'exercice. L'activation de la LHS par l'épinéphrine et la contraction musculaire ayant été démontrées, il serait possible que la LHS soit impliquée dans cette utilisation des TG (Langfort, Ploug et al. 1998).

En réponse à une stimulation à l'insuline, l'apport du glucose par les cellules cardiaques des souris déficientes en LHS est diminué de 40 % (Park, Kim et al. 2005). Par ailleurs, ces souris LHS^{-/-} démontrent une protection contre une résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras au niveau du muscle squelettique et du cœur contrairement aux souris contrôles. De plus, il y a réduction du niveau de triglycérides et des esters de CoA intramusculaires chez les souris LHS^{-/-} nourries avec une diète riche en gras qui semble être due à la réduction de la lipolyse adipocytaire. L'effet direct de la déficience en LHS dans le muscle squelettique ne peut donc pas être conclue uniquement d'après ces données (Park, Kim et al. 2005).

1.8.3 Régulation de la lipase hormono-sensible par phosphorylation réversible :

L'activité de la LHS est régulée en partie par phosphorylation réversible. Ceci est médié par des hormones. Les catécholamines, comme l'ACTH et l'épinéphrine, sont d'importants activateurs de la lipolyse médiée par la LHS, tandis que l'insuline joue un rôle anti-lipolytique majeur (Holm 2003). Le mécanisme le plus connu régulant la phosphorylation de la LHS est celui via la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA).

Initialement, deux sites de phosphorylation ont été identifiés dans la séquence de la LHS. Il s'agit des sérines Ser563 (site 1) et Ser565 (site2) correspondant tous deux aux positions sur le gène homologue chez le rat. Le site 1 serait phosphorylé en réponse à une stimulation par la kinase PKA tandis que le site 2 serait phosphorylé à l'état basal. La phosphorylation du site 2 empêche la phosphorylation du site 1 et diminue l'activité de la lipase. Il s'agirait donc d'un mode de régulation négative (Holm, Osterlund et al. 2000).

En plus de la PKA, le site 2 peut être phosphorylé par d'autres kinases comme la GSK (*glycogen synthase kinase*), l'AMPK (*AMP-dependent protein kinase*) et la CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*). Cependant, ces enzymes n'activent pas la LHS (Holm, Osterlund et al. 2000).

La mutagenèse du résidu Ser563 (correspondant au site 1) n'abolit pas l'activité de la lipase. Les sérines aux positions 659 et 660, phosphorylables par la protéine kinase A ont ensuite été identifiées (Anthonsen, Ronnstrand et al. 1998).

Les connaissances sur les mécanismes de régulation de la lipolyse ont été initialement limité à l'activation de la protéine kinase A. L'induction de la voie MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) par l'AMPc a été mise en évidence (Vossier, Yao et al. 1997). Ceci a permis d'identifier le résidu Ser600 comme un site phosphorylé suite à l'activation de la protéine kinase ERK.

Ceci entraîne l'induction de l'activité de la lipase LHS à un niveau similaire à celui induit par la protéine kinase A (Anthonsen, Ronnstrand et al. 1998; Greenberg, Shen et al. 2001).

La phosphorylation de la LHS est réversible. Les résidus sérines aux positions 563 et 565 sont cibles de déphosphorylation par les protéines phosphatases PP2A (*protein phosphatase 2A*), PP2C et PP1. Par ailleurs, PP2A et PP1 sont les deux protéines phosphatases majeures régulant l'activité de la LHS. Leur expression est d'ailleurs prédominante dans le tissu adipeux (Holm, Osterlund et al. 2000; Yeaman 2004).

1.8.4 Régulation de la spécificité tissulaire :

Le gène humain de la lipase hormono-sensible est positionné sur le bras long du chromosome 19 désigné locus LIPE (19q13.1 – 19q13.2) (Holm, Kirchgessner et al. 1988). Celui de la souris est situé au niveau de la région homologue sur le chromosome 7. Il est toutefois distinct des deux loci relatifs aux gènes de l'obésité chez la souris, soient *Ad* (*adult obesity et diabetes*) et *Tub* (*tubby*), retrouvés dans cette région du chromosome (Wang, Lapierre et al. 1994).

Le gène de la LHS comporte plusieurs exons et promoteurs alternatifs qui sont utilisés selon un patron tissu-spécifique. Les éléments régulateurs sont toutefois plus rares. Le promoteur minimal humain régulant l'expression de la LHS dans les cellules adipocytaires a été caractérisé. Ces études ont toutefois infirmé la présence de l'élément régulateur *cis* conférant la spécificité tissulaire à l'intérieur de la séquence de 2,1 kb située immédiatement en amont de l'exon B (Grober, Laurell et al. 1997). La spécificité tissulaire dans les testicules a quant à elle été identifiée comme étant régulée par la séquence de 0,5 kb située immédiatement en amont de l'exon T (Blaise, Grober et al. 1999). D'autres éléments régulateurs de la spécificité tissulaire ont été identifiés chez la souris (Li, Sumida et al. 1994) et chez l'humain (Talmud, Palmen et al. 1998), mais leur importance physiologique reste à déterminer.

1.8.5 Régulation hormonale et physiologique

Les études effectuées sur les modèles d'adipocytes différenciés en culture ont permis d'investiguer les effets de différents facteurs nutritionnels et hormonaux sur l'expression de la LHS. Par exemple, l'AMPc ainsi que les esters de phorbol diminuent l'expression de la lipase hormono-sensible dans les cellules 3T3-F442A différenciées (Plée-Gautier, Grober et al. 1996). L'insuline, l'hormone de croissance, l'acide rétinoïque (Plée-Gautier, Grober et al. 1996) et l'acide oléique (Antras-Ferry, Robin et al. 1995; Raclot, Dauzats et al. 1998) quant à eux n'ont montré aucun effet sur l'expression de la lipase dans ces mêmes cellules. À l'aide du modèle d'adipocytes de rat en culture, Slavin et al. n'ont également observé aucun effet ni par l'hormone de croissance ni par l'adrénaline (Slavin, Ong et al. 1994). Par ailleurs, ces auteurs ont noté une induction des niveaux de l'ARNm de la LHS de quatre fois par le dexaméthasone. Plée-Gauthier et al. quant à eux n'ont rapporté aucun effet direct par le dexaméthasone seul, mais plutôt une potentialisation de l'effet de l'AMPc (Plée-Gautier, Grober et al. 1996). D'autres données contradictoires ont été obtenues concernant l'effet du glucose. En effet, Raclot et al. ont rapporté une réduction des niveaux de l'ARNm de la LHS par un facteur de 2,5 à 3 dans les cellules 3T3-F442A (Raclot, Dauzats et al. 1998). Botin et al., quant à eux, n'ont observé aucun effet du glucose seul, mais plutôt une sur-régulation en réponse à de hauts niveaux de glucose en présence de l'insuline dans les cellules primaires de rat différenciées en culture (Botin and Green 1999). Ces divergences dans les données peuvent être expliquées par la différence entre les systèmes cellulaires étudiées.

L'implication du TNF- α dans l'obésité et la résistance à l'insuline a poussé les recherches à étudier son effet sur l'expression de la LHS. Des études ont rapporté que l'incubation des cellules 3T3-L1 différenciées en présence de cette cytokine avait pour effet une régulation à la baisse de la LHS au niveau de l'ARNm, de la protéine ainsi que de l'activité enzymatique (Sumida, Sekiya et al. 1990; Souza, de Vargas et al. 1998). Dans une étude distincte, effectuée sur les adipocytes primaires de rat, aucune altération des niveaux protéiques de la lipase n'a été observée suite à un

traitement au TNF- α (Green, Dobias et al. 1994). La régulation à la baisse de la LHS par le TNF- α concorde avec la capacité à inverser le processus de différenciation connue de cette cytokine (Holm, Osterlund et al. 2000) tandis que son effet prolipolytique pourrait être expliqué par la baisse des niveaux de réestérification intracellulaire des acides gras (Hotamisligil and Spiegelman 1994) et/ou la diminution de l'expression de la périlipine (Souza, de Vargas et al. 1998). Cela dit, ces données sont consistantes avec une implication du TNF- α dans la lipolyse LHS-indépendante, car la lipolyse est augmentée en dépit de la diminution de l'expression de la LHS.

À l'état de jeûne, les niveaux plasmatiques d'acides gras non-estérifiés augmentent à cause de l'induction de la lipolyse ainsi que de la diminution des taux de réestérification des acides gras (Frayn, Coppack et al. 1995). Dans ce cas, la LHS est régulée de deux façons dépendamment si le jeûne est aigue ou chronique. Par exemple, lors d'un jeûne à court terme, il y a élévation des niveaux d'acides gras non-estérifiés. La LHS est à ce moment sous régulation post-traductionnelle. Si le jeûne est chronique, la LHS est alors sous contrôle pré-traductionnelle (Sztalryd and Kraemer 1994). La lipolyse LHS-indépendante augmente quant à elle chez les souris LHS-/- en état de jeûne (Fortier et al. 2003).

1.9 TGH (*TRIACYLGLYCEROL HYDROLASE*)

1.9.1 *Propriétés structurales et enzymatiques*

À la suite d'une prise de repas, le foie accumule les acides gras circulants et les entrepose sous forme de triglycérides (TG). Ces TG sont par la suite relâchés par le foie sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL; *very low density lipoproteins*). Les TG intracellulaires doivent être hydrolysés pour que les acides gras ainsi libérés soient par la suite réestérifiés pour être retransformés en TG et incorporés dans les particules de VLDL (Gilham, Alam et al. 2005). La TGH a été

identifiée comme l'enzyme responsable de l'hydrolyse dans ce processus (Lehner and Verger 1997).

La TGH est une protéine de 60 kDa localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique (Gilham, Alam et al. 2005), initialement purifiée à partir de microsomes de foie de porc (Lehner and Verger 1997). L'enzyme purifiée a démontré une activité hautement spécifique envers les TG à courte chaîne et moindrement envers les substrats à plus longue chaîne (Lehner and Verger 1997). L'enzyme n'hydrolyse ni les phospholipides ni les thioesters d'acyl-CoA (Lehner and Verger 1997). L'activité optimale de la TGH n'est pas altérée par l'absence de cations divalents. Elle est toutefois inhibée par le diethyl-p-nitrophenylphosphate (E600) et le tetrahydrolipstatine, deux composés modificateurs des résidus sérines indiquant ainsi la propriété estérase de sérines de la TGH (Lehner and Verger 1997).

Les ADNc de la TGH humaine (Alam, Ho et al. 2002), de souris (Dolinsky, Sipione et al. 2001) et de rat (Lehner and Vance 1999) ont été clonés. Celui de la souris ainsi que celui du rat encodent tous deux des protéines de 565 acides aminés tandis que l'ADNc de la TGH humaine en encode 568.

Le gène humain de la TGH est positionné sur le chromosome 16q12.2. Celui de la souris est situé sur le chromosome 8 (figure 6). La séquence protéique de la TGH est constituée de divers motifs structuraux et fonctionnels. La partie N-terminale est formée d'un peptide signal de 18 acides aminés responsables de diriger la synthèse protéique vers la lumière du réticulum endoplasmique où la protéine a été immunodétectée. Cette séquence signal est par la suite excisée par une peptidase spécifique dans la lumière du RE (Lehner and Verger 1997).

Les résidus catalytiques sont conservés entre un bon nombre d'espèces mammifères incluant la souris, le rat, le lapin, le singe et l'humain (Dolinsky, Gilham et al. 2004). La triade catalytique de l'enzyme TGH est constituée de trois résidus hautement conservés, soit Ser221, Glu353 (354) et His466 (468) et qui sont impliqués dans

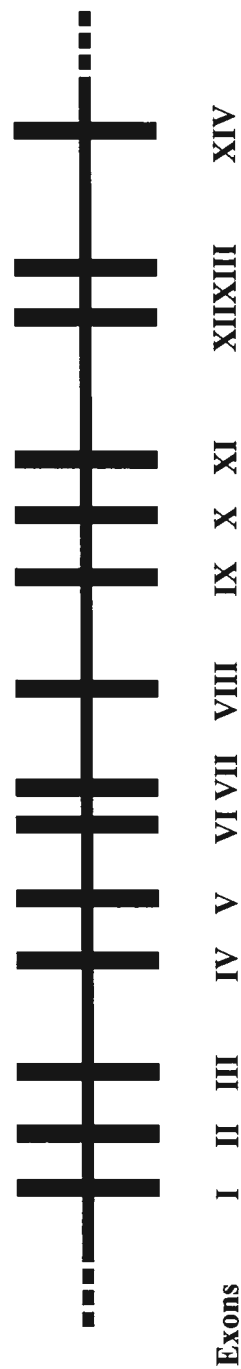


Figure 6 Organisation des exons et introns du gène de la TGH de souris. Le gène de la TGH comprend 14 exons (rectangles noirs) et 13 introns. Adaptée de (Dolinsky, Sipione et al. 2001).

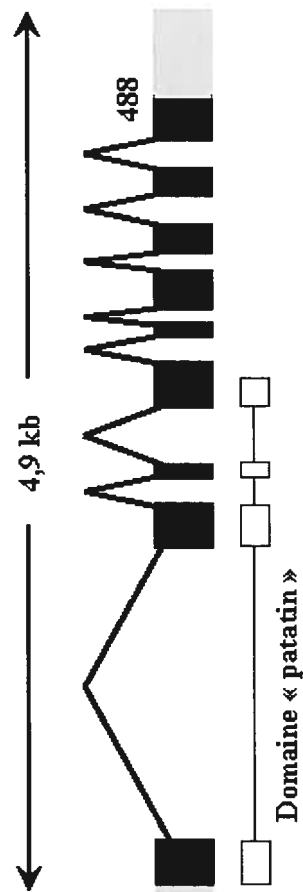


Figure 7 Organisation des exons et introns du gène de l'ATGL de souris. Le gène de l'ATGL est composé de 9 exons (rectangles noirs) et 8 introns. En gris, des séquences non traduites. Tiré de (Kim, Tillison et al. 2006).

l'induction de l'activité catalytique de l'enzyme (Dolinsky, Gilham et al. 2004). Chez la souris comme chez le rat, les résidus Asn79 et Asn489 ont été identifiés comme sites de glycosylation. Chez l'humain, le résidu Asn79 a été identifié comme étant l'unique site de glycosylation (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

La structure protéique contient également un domaine hydrophobe composé des acides aminés 414 à 429, pouvant être responsable des interactions lipidiques (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

La structure C-terminale HAEL chez le rat fonctionnerait comme un signal de séquestration (Robbi and Beaufay 1991). Pareillement, les séquences HVEL de souris et HIEL de l'humain seraient responsables de la rétention de la TGH dans la lumière du réticulum endoplasmique (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

La TGH possède un repliement tridimensionnel α - β -hydrolase caractéristique de toutes les lipases connues (Wong and Schotz 2002).

Les carboxylesterases sont caractérisées par leur rôle dans le métabolisme des drogues et la détoxification. Ces enzymes possèdent la capacité d'hydrolyser les liens esters, thioesters et amines (Sato and Hosakawa 1998). Certaines carboxylases sont également capables de lier et retenir des protéines à l'intérieur d'un compartiment subcellulaire spécifique (Yue, Muller-Greven et al. 1996).

La lignée cellulaire McArdle RH7777 (hépatomes de rat) ainsi que la lignée HepG2 (hépatomes humains) sont des cellules fréquemment utilisées en tant que modèles pour l'étude de l'assemblage des particules de lipoprotéines ainsi que leur sécrétion par le foie. Les études effectuées sur les cellules McArdle RH7777 ont permis de mettre en évidence l'implication de la TGH dans la lipolyse des TG entreposés. Ces cellules n'expriment pas la TGH (Lehner and Vance 1999). De plus, contrairement aux hépatocytes, les cellules McArdle RH7777 requièrent leur incubation en présence d'acides gras pour pouvoir sécréter les lipides (Lehner and Vance 1999). Lorsque

transfectées de façon stable avec l'ADNc de la protéine TGH du rat, la déplétion des TG intracellulaires est doublée. De plus, le niveau de sécrétion des TG dans le milieu est augmenté de 25 % en lien avec l'augmentation des niveaux d'apoB100, la protéine des particules de VLDL (Lehner and Vance 1999). Lorsque la lipolyse est inhibée par l'ajout de l'inhibiteur spécifique de l'activité estérase de sérines E600 ainsi que par l'ajout de l'inhibiteur spécifique de la TGH, le 4,4,4-trifluoro-2-[2-(3-methylphenyl)hydrozono]-1-(2-thienyl)butane-1,3-dione, le niveau de sécrétion des TG et de l'apoB est diminuée dans les hépatocytes primaires de rat tout comme dans les cellules McArdle RH7777 transfectées de façon stable avec l'ADNc de la TGH (Gilham, Ho et al. 2003).

Quelques inhibiteurs réversibles de la TGH ont été identifiés par des études protéomiques (*activity-based protein profiling strategy*). L'alkyl/aryl trifluoromethyl ketone en est le plus sélectif et efficace (Leung, Hardouin et al. 2003).

1.9.2 Profil d'expression tissulaire de la TGH

Dans les divers tissus des mammifères, plusieurs isoformes de carboxylases ont été identifiés. Ils possèdent des caractéristiques biochimiques, immunologiques et génétiques distinctes (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

La protéine TGH ainsi que l'ARNm y correspondant sont exprimés de façon prédominante dans le foie (Dolinsky, Gilham et al. 2004). Ils ont également été détectés à de plus faibles niveaux dans le tissu adipeux (Lee, Ryu et al. 2000), l'intestin, les reins, le cœur, les testicules (Hummerickhouse, Lohrbach et al. 2000) ainsi que les macrophages (Ghosh 2000). Leur présence n'a toutefois été détectée ni dans le cerveau, ni dans la rate ou dans le muscle squeletteique (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

TGH dans le foie :

Par analyses immunocytochimiques, la TGH a été exclusivement localisée dans les hépatocytes périveneux (Lehner, Cui et al. 1999). La région périveneuse du lobule hépatique est apparemment activement impliquée dans la sécrétion et la production des lipoprotéines (Dolinsky, Gilham et al. 2004). La TGH serait directement associée à l'ApoB, principale apolipoprotéine composant les particules de VLDL (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

TGH dans le tissu adipeux :

Les études protéomiques effectuées au laboratoire par Dr. K. Soni ont permis d'identifier la TGH comme étant une lipase majeure dans le tissu adipeux blanc (Soni, Lehner et al. 2004). Les résultats suggèrent une implication majeure de la TGH dans l'activité lipolytique basale mesurée dans le tissu adipeux des souris déficientes en lipase hormono-sensible (souris LHS-/-). La TGH pourrait être responsable de médier la lipolyse LHS-indépendante (Soni, Lehner et al. 2004). Les analyses microscopiques effectuées à l'aide du modèle de cellules NIH 3T3-F442A différenciées en culture corrélaient avec la distribution de la TGH au niveau du réticulum endoplasmique, du cytosol ainsi que de la gouttelette lipidique (Soni, Lehner et al. 2004).

TGH dans d'autres tissus :

La TGH est exprimée dans l'intestin grêle (Lehner and Verger 1997; Dolinsky, Sipione et al. 2001). Plus précisément, elle se trouve majoritairement dans la partie duodénum/jéjunum de l'intestin grêle des souris. La TGH intestinale aurait un rôle dans la sécrétion des lipoprotéines riches en TG et en ApoB. En effet, il a été démontré que les TG entreposés à l'intérieur des entérocytes passent au travers d'un

cycle de lipolyse suivi d'une réestérification, comme dans le cas des hépatocytes, pour être ensuite sécrétés sous forme de particules de chylomicrons (Yang and Kuksis 1991).

Le rôle de la TGH dans les macrophages n'est pas encore tout à fait clair. Jusqu'à présent, l'activité hydrolase des esters de cholestérol (EC) dans les macrophages est majoritairement associée à la lipase hormono-sensible (Jepson, Harrison et al. 1996). En effet, le chargement des macrophages en stérols diminue l'expression de la LHS ainsi que son activité hydrolase (Jepson, Harrison et al. 1996). Toutefois, bien que la surexpression de la LHS dans les macrophages augmente le niveau d'hydrolyse des EC ainsi que le flux de cholestérol (Escary, Choy et al. 1998), ces derniers restent inchangés dans les macrophages des souris LHS(-/-) (Contreras 2002). Par ailleurs, il est possible que ceci soit dû à un effet compensatoire qui surinduirait l'activité d'hydrolase LHS-indépendante (Dolinsky, Gilham et al. 2004). Les cellules CHO ont la caractéristique d'avoir de larges dépôts en EC intracellulaires dû à la surexpression de la protéine ACAT1 (*acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1*) (Ghosh, St Clair et al. 2003). L'expression de la TGH dans ces cellules augmente l'hydrolyse des EC ainsi que le flux de cholestérol (Ghosh, St Clair et al. 2003). Ceci est également observé lorsque la TGH est exprimée dans les cellules COS (Ghosh 2000). Cependant, l'induction de l'expression de la TGH humaine dans les macrophages chargés de stérols n'est pas consistante avec la diminution observée de l'activité hydrolase des EC (Jepson, Harrison et al. 1996).

Des études ont révélé des évidences quant à l'expression de la TGH dans les glandes mammaires, la peau, l'épithélium olfactif, les glandes salivaires, le globe oculaire, les testicules, les ovaires et l'utérus (Dolinsky, Gilham et al. 2004), mais son rôle dans ces tissus reste à élucider. La TGH serait impliquée dans l'infertilité chez divers organismes (Mikhailov and Torrado 2000).

Dans les reins comme dans le cœur, le rôle de la TGH dans la sécrétion des lipoprotéines est encore inconnu (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

1.9.3 Régulation transcriptionnelle de la TGH :

Les promoteurs du gène de la TGH de souris et de rat ont en commun plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription (Dolinsky, Gilham et al. 2004). Il s'agit entre autres de trois sites de liaison au facteur Sp1, un pour le facteur NF-1, un pour l'élément de réponse du facteur PPAR (*peroxisomal proliferator-activator receptor*) et trois séquences pour l'élément de réponse au stérol (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

Le facteur de transcription Sp1 est un activateur efficace du promoteur de la TGH (Dolinsky, Gilham et al. 2004). C'est une protéine nucléaire ubiquitaire qui active la transcription d'un bon nombre de gènes (Suske 1999). Le promoteur de la TGH est sans séquence TATA, ce qui le rend particulièrement sensible à la régulation par la famille des facteurs Sp (Suske 1999).

Les facteurs de transcription qui régulent l'induction de l'expression de la TGH durant la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1 sont encore inconnus. Bien que l'expression de la TGH soit augmentée lorsque les cellules se différencient en présence d'un agoniste PPAR γ , il n'y a pas d'évidence d'un effet direct de PPAR γ sur l'expression de la TGH (Dolinsky, Gilham et al. 2003).

Le facteur C/EBP α induit l'activation de la transcription de plusieurs gènes adipocytaires. Wei et al. ont rapporté l'induction de la transcription du gène de la TGH durant la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes. Ceci se fait par la liaison de deux sites sur C/EBP (-470/-459 bp et -404/-390 bp) à la région distale du promoteur TGH (Wei, Lehner et al. 2005).

1.9.4 Régulation hormonale et nutritionnelle de la TGH :

L'expression de la protéine TGH ainsi que celle de son ARNm varient avec les conditions nutritionnelles où ils sont induits lors du sevrage des souris et des rats ce qui est consistant avec l'élévation des taux de sécrétion des particules de VLDL (Morgan, Yan et al. 1994).

Des données contradictoires ont été rapportées concernant l'effet d'une diète riche en acides gras et en cholestérol sur l'expression de la TGH (Dolinsky, Gilham et al. 2004). En effet, bien que le degré de saturation des acides gras et l'ajout du cholestérol à la diète influencent l'homéostasie énergétique, l'enrichissement de la diète de 20 % d'acides gras n'affecte pas les niveaux d'expression de la TGH dans le foie, et ce, peu importe leurs niveaux de saturation (Dolinsky, Gilham et al. 2003). De plus, les études effectuées sur les souris PPAR α null n'ont révélé aucune régulation directe de l'expression de l'ARNm de la TGH par ce facteur (Dolinsky, Gilham et al. 2003). Ceci suggère que les variations des niveaux d'expression de cette lipase sont plutôt dues à une réponse secondaire suite à un effet chronique de l'administration des agonistes PPAR α (Dolinsky, Gilham et al. 2004). D'autre part, l'ajout du cholestérol à une diète riche en acides gras a pour effet d'augmenter les niveaux d'expression de la TGH d'un facteur d'environ deux (Dolinsky, Gilham et al. 2003). En somme, l'expression de la TGH ne semble pas être directement affectée par les PPARs ni par les acides gras, et ce, dans l'hépatocyte comme dans l'adipocyte.

Les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone) induisent l'augmentation des TG circulants, leur synthèse et leur entreposage (Glenny and Brindley 1978). Le dexaméthasone (Dex) est un analogue efficace des glucocorticoïdes. L'expression de l'ARNm de la TGH ainsi que celle de la protéine elle-même sont atténuées par le dexaméthasone. L'activité estérase des microsomes hépatiques est également diminuée (Morgan, Yan et al. 1994). Il a été rapporté que le dexaméthasone agirait par un mécanisme affectant la stabilité de l'ARNm de la TGH via trois éléments riches en AU sur la séquence 3' non traduite de l'ARNm de la TGH de souris

(Dolinsky, Douglas et al. 2004). La diminution de l'expression de la TGH par le dexaméthasone est associée à une suppression du taux de renouvellement des TG intracellulaires (Dolinsky, Douglas et al. 2004). Dans ce cas, les TG s'accumulent dans le foie des souris injectées avec le dexaméthasone. Ces données reflètent les altérations qui ont lieu lors des changements journaliers en lipides hépatiques en fonction des niveaux de glucocorticoïdes circulants (Dolinsky, Douglas et al. 2004).

1.9.5 Régulation post-traductionnelle de la TGH :

La protéine TGH mature est glycosylée sur les résidus Asn79 et Asn489 de la séquence de souris et sur l'unique site Asn79 chez l'humain (Alam, Vance et al. 2002). Toutefois, la mutation du résidu Asn79 en Ala ou en Gln n'a pas donné lieu à une diminution significative de l'activité de la TGH. Ceci indique que la glycosylation n'est pas nécessaire pour l'activité estérase de la protéine (Alam, Vance et al. 2002).

La séquence primaire de la TGH humaine contient un résidu tyrosine phosphorylable (Tyr118) ainsi que sept autres séquences consensus Ser/Thr phosphorylables par la CKII (*casein kinase II*) (Dolinsky, Gilham et al. 2004). Le résidu Tyr118 est situé à proximité de la boucle de pont disulfure formée par les résidus Cys87 et Cys116 et régulerait possiblement l'entrée des substrats à l'intérieur du site actif de l'enzyme (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

La TGH est également phosphorylée de manière réversible (Dolinsky, Gilham et al. 2004). La phosphorylation du résidu Ser506 entraînerait un changement conformationnel favorisant la liaison des substrats hydrophobes. Ce rôle est toutefois mis en question étant donné l'absence de ce résidu dans les séquences protéiques orthologues (Dolinsky, Gilham et al. 2004).

1.10 ATGL (ADIPOSE TRIGLYCERIDE LIPASE) :

Récemment, l'identification d'une nouvelle lipase adipocytaire, distincte de la TGH, a été rapportée dans trois publications indépendantes. Tout d'abord, Zimmerman et al. ont identifié cette nouvelle enzyme sous le nom de ATGL (*adipose triglyceride lipase*). Ceci a été fait en examinant les bases de données de protéines et de gènes avec des motifs structuraux connus, caractéristiques des lipases (Zimmermann, Strauss et al. 2004).

D'autre part, Jenkins et al. ont étudié trois isoformes de la phospholipase A₂s indépendante du calcium (PLA₂s) (Jenkins, Mancuso et al. 2004). Il s'agit des protéines iPLA₂ε (adiponutrin), iPLA₂ζ (TTS-2.2) et iPLA₂η (GS2). Ces trois isoformes ont en fait une importante activité d'hydrolase de triglycérides. L'iPLA₂ζ (TTS-2.2) semble être identique à ATGL (Raben and Baldassare 2005).

Dans une troisième étude, Villena et al. ont identifié la desnutrine par expression différentielle des gènes en étudiant les protéines spécifiquement adipocytaires (Villena, Roy et al. 2004). La desnutrine contient dans sa structure protéique un domaine patatin identique à celui de l'ATGL (et de l'iPLA₂ζ). Le domaine patatin est en fait retrouvé dans les protéines ayant une activité acyl-hydrolase des phospholipides, des monoglycérides ainsi que des substrats diglycérides (Zimmermann, Strauss et al. 2004). Par exemple, il est présent dans la structure de la TGL3, une lipase de triglycérides exprimée chez la *Saccharomyces cerevisiae* (Arthenstaedt and Daum 2003) ainsi que dans la structure de la phospholipase A2 cytosolique humaine (Dessen, Tang et al. 1999).

L'expression ectopique de la desnutrine dans les cellules COS-7 stimule l'hydrolyse des triglycérides dans ces cellules (Villena, Roy et al. 2004). Pour des raisons de simplification, la lipase ainsi identifiée sera nommée ATGL pour le reste de ce mémoire.

1.10.1 Propriétés structurales et enzymatiques

Le gène de l'ATGL de souris est positionné sur le chromosome 7. Il code pour 486 acides aminés qui donnent lieu à une protéine de 54 kDa. Le gène humain de l'ATGL est situé sur le chromosome 11p15.5 et encode 504 acides aminés correspondant à une protéine identique à 86 % à celle de la souris (Zimmermann, Strauss et al. 2004).

Le domaine N-terminal de la protéine ATGL est composé d'environ 260 résidus et il est constitué d'un domaine de repliement α/β , caractéristique des estérases (Tatusov, Natale et al. 2001) ainsi qu'un site putatif avec sérine 47 active, GXSXG. La structure contient également des domaines patatin détectables dans certaines régions (figure 7).

1.10.2 Profil d'expression de l'ATGL :

L'ATGL est fortement exprimée dans les tissus adipeux blanc et brun de la souris et de l'humain (Villena, Roy et al. 2004; Zimmermann, Strauss et al. 2004). Par immunodetection, l'ATGL a été détectée au niveau des gouttelettes lipidiques des cellules non adipocytaires (Smirnova, Golberg et al. 2005). La surexpression de l'ATGL dans les cellules COS a eu pour effet une diminution marquée de la taille des gouttelettes tandis que l'atténuation de l'expression de l'ATGL par interférence à l'ARN résulte en une augmentation significative de la taille des gouttelettes (Smirnova, Golberg et al. 2005). Par microscopie confocale, Villena et al. ont localisé cette protéine au niveau du cytoplasme des cellules préadipocytaires 3T3-L1 différenciées où sa surexpression induisait une élévation du taux d'hydrolyse des triglycérides (Villena, Roy et al. 2004).

L'ATGL est également exprimée à de plus faibles niveaux dans plusieurs autres tissus incluant les testicules, le muscle cardiaque et squelettique, mais son rôle reste à

être plus amplement documenté (Villena, Roy et al. 2004; Zimmermann, Strauss et al. 2004).

1.10.3 Régulation hormonale et nutritionnelle

L'état nutritionnel est un facteur régulateur important de l'expression de l'ATGL. En effet, ses niveaux d'ARNm sont transitoirement induits dans les adipocytes durant le jeûne des souris (Villena, Roy et al. 2004). *In vitro*, l'expression de l'ATGL est induite par le dexaméthasone de façon dépendante du temps et de la dose (Villena, Roy et al. 2004). L'AMPc, quant à lui, n'avait pas d'effet sur l'expression de l'ATGL. Ces études suggèrent que la régulation par le changement nutritionnel se fait via la liaison des glucocorticoïdes à leur récepteurs et n'implique pas le glucagon (Villena, Roy et al. 2004).

L'expression du gène de l'ATGL est abaissée chez les modèles de souris obèses *ob/ob* et diabétiques *db/db*, ce qui suggère un rôle de cette enzyme dans le métabolisme lipidique (Villena, Roy et al. 2004).

Le traitement des cellules 3T3-L1 différenciées avec l'isopropanol (agoniste β -adrénergique), le TNF- α ainsi que l'insuline a pour effet de provoquer une baisse significative (74 %, 17 % et 49 % respectivement) du niveau d'ARNm de l'ATGL (Kralisch, Klein et al. 2005). L'effet de ces facteurs est dépendant de la dose et du temps, tout comme observé pour les niveaux d'ARNm de la LHS (Kralisch, Klein et al. 2005).

1.11 MÉCANISMES MOLÉCULAIRES RÉGULANT LA LIPOLYSE

La lipolyse adipocytaire est sous contrôle d'hormones. Les catécholamines, comme l'ACTH et l'épinephrine, sont d'importants stimulants de la lipolyse tandis que l'insuline joue un rôle anti-lipolytique majeur.

Le mécanisme classique, le plus connu, régulant la lipolyse est celui de la voie de la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) via les récepteurs couplés aux protéines G (Carmen and Victor 2005).

Les catécholamines lient les récepteurs α_2 , β_1 , β_2 et β_3 -adrénergiques. Les récepteurs β -adrénergiques sont couplés aux protéines Gs stimulatrices de la formation de l'AMPc et leur activité stimule la lipolyse adipocytaire. La forme α_2 des récepteurs, quant à elle, est couplée aux protéines Gi inhibitrices de la formation de l'AMPc et inhibe donc de la lipolyse (Carey 1998).

1.11.1 Voie de la PKA :

Le récepteur β_3 -adrénergique est celui exprimé le plus abondamment à la surface des cellules du tissu adipeux blanc des souris. La liaison des catécholamines aux récepteurs β_3 -adrénergiques entraîne l'activation de l'adénylate cyclase via les protéines Gs. L'adénylate cyclase synthétise de l'AMPc à partir de l'ATP. L'élévation de la production de l'AMPc entraîne alors l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Carmen and Victor 2005).

Les deux principales cibles protéiques phosphorylées par la PKA sont la lipase hormono-sensible (LHS) et la périlipine (PL). Cette dernière est une phosphoprotéine recouvrant la surface des gouttelettes lipidiques à l'intérieur des adipocytes (Londos, Brasaemle et al. 1999). Dans le tissu adipeux, il en existe deux isoformes : la périlipine A (56 kDa) et la périlipine B (46 kDa). En l'absence de stimulation lipolytique, la périlipine est localisée à la surface de la gouttelette lipidique. Elle s'y

détache lorsque phosphorylée. Ceci permet la translocation de la LHS phosphorylée à la surface de la gouttelette, rendant ainsi les triglycérides (TG) plus accessibles à la dégradation (Clifford, Londos et al. 2000).

L'activation de la LHS est induite à la fois suite à sa phosphorylation, sa translocation, sa dimérisation ainsi qu'à son interaction avec les protéines lipotransine (Syu et al. 1999) et ALBP (*adipocyte fatty acid binding protein*, désignée aP2 dans le tissu adipeux) (Shen et al. 1999). La région d'interaction de la LHS avec la lipotransine n'a toutefois pas été identifiée et ces observations n'ont pas été reproduites. L'interaction de la lipase avec la protéine ALBP faciliterait l'évacuation des composés lipidiques tandis que la lipotransine lierait et transporterait la LHS à partir du compartiment cytosolique vers la surface de la gouttelette lipidique (Holm 2003).

1.11.2 Voie indépendantes de la PKA

En plus d'activer la PKA, les catécholamines stimulent également la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ERK 1,2 (*extracellular signal-regulated kinase*). En effet, des études ont révélé que cette voie est activée via le couplage des récepteurs β_3 -adrénergiques aux protéines G_i inhibitrices (Carmen and Victor 2005).

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL :

1.12 L'APPAREIL LIPOLYTIQUE

Il y a de plus en plus d'évidences quant à l'existence de plus d'un mécanisme lipolytique à l'intérieur de l'adipocyte. L'appareil lipolytique est mis en place au cours de la différenciation adipocytaire. Des études ont démontré l'expression de protéines de la gouttelette lipidique sur la membrane du réticulum endoplasmique

(Blanchette-Mackie, Dwyer et al. 1995; Brasaemle, Barber et al. 1997). Au laboratoire, nous avons démontré par immunocytochimie l'expression de la TGH à proximité de la surface de la gouttelette lipidique. Nous avons également démontré la colocalisation de cette lipase avec la périlipine (Soni, Lehner et al. 2004). Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle les gouttelettes lipidiques naissent à partir du réticulum endoplasmique (figure 8) (Murphy and Vance 1999).

Comment la TGH, une protéine du réticulum endoplasmique, pourrait-elle être impliquée dans la lipolyse adipocytaire ? Une hypothèse stipule que par l'assemblage des vésicules lipidiques, TGH soit exprimée à la surface même de la gouttelette et assure de ce fait un niveau basal d'hydrolyse des TG (figure 9). Ceci se fait en parallèle à la synthèse des lipides par DGAT suivant un cycle futile entre les DG et les TG (figure 10). L'importance relative de l'ATGL et de la TGH dans ce processus reste à déterminer. La libération nette d'acides gras serait régulée dépendamment des besoins énergétiques de l'organisme par des mécanismes à déterminer. L'induction de l'AMPc par la stimulation des récepteurs β_3 -adrénergiques provoquerait la translocation de la LHS à la surface de la gouttelette lipidique, ce qui enclencherait une accélération de la vitesse d'hydrolyse des TG. Dans ce scénario, il existe un goulot d'étranglement au niveau des DG, car l'hydrolase principale des DG dans le TABI est la LHS. Dans les situations urgentes en besoin énergétique, la stimulation catécholaminergique avec l'activation et la translocation de la LHS déclencherait la voie classique complète de la lipolyse afin de libérer rapidement des acides gras et du glycérol. L'importance de la lipolyse et de la lipogenèse dans l'obésité et ses complications est évidente. Les rôles des différentes lipases, des glycérol-acyl transférase et des protéines de la monocouche à la surface de la gouttelette lipidique sont inconnus. Ces composantes méritent chacune d'être explorées en détail, vu leur importance potentielle pour l'obésité et le diabète de type II.

1.13 LES DIFFÉRENTES MODALITÉS POUR ÉTUDIER LES ADIPOCYTES :

L'adipocyte peut être étudié de 3 principales façons : l'animal intact, les adipocytes primaires isolés et les cellules adipocytaires en culture. Chacun de ces modèles comporte des avantages et des inconvénients.

Les études physiologiques sur la souris intacte ont été mises au point et sont bien établies dans notre laboratoire. Les essais effectués sur l'animal en entier permettent une vue intégrale du métabolisme lipidique de l'organisme. Les observations sont effectuées dans des conditions physiologiques et fournissent des données résultant de l'ensemble des organes en interaction les uns avec les autres. Cependant, ces interactions inter-organes compliquent l'interprétation des données.

Le modèle de l'adipocyte isolé est aussi établi au laboratoire. Toutefois, dû à la fragilité des adipocytes primaires isolés et leur courte période de viabilité (moins que 4 heures), ils ne permettent pas l'étude à moyen ou à long terme.

Il devenait donc essentiel de développer un modèle d'étude qui contournerait les obstacles rencontrés lors de l'utilisation de l'animal et de l'adipocyte isolé. Nous avons choisi de mettre en place un modèle de différenciation adipocytaire en culture. Ces cellules peuvent être cultivées et différenciées en dehors d'interférences d'autres organes. Elles ne nécessitent aucun traitement drastique tel que le traitement à la collagénase comme dans le cas des adipocytes isolés. De plus, ils permettent l'étude des effets chroniques de certains facteurs qui nécessitent une plus longue exposition tels la cytokine TNF- α . Le modèle des adipocytes différenciés en culture apporterait des informations uniques et complémentaires à ceux obtenues à partir du modèle de l'adipocyte isolé et celui de l'animal intact.

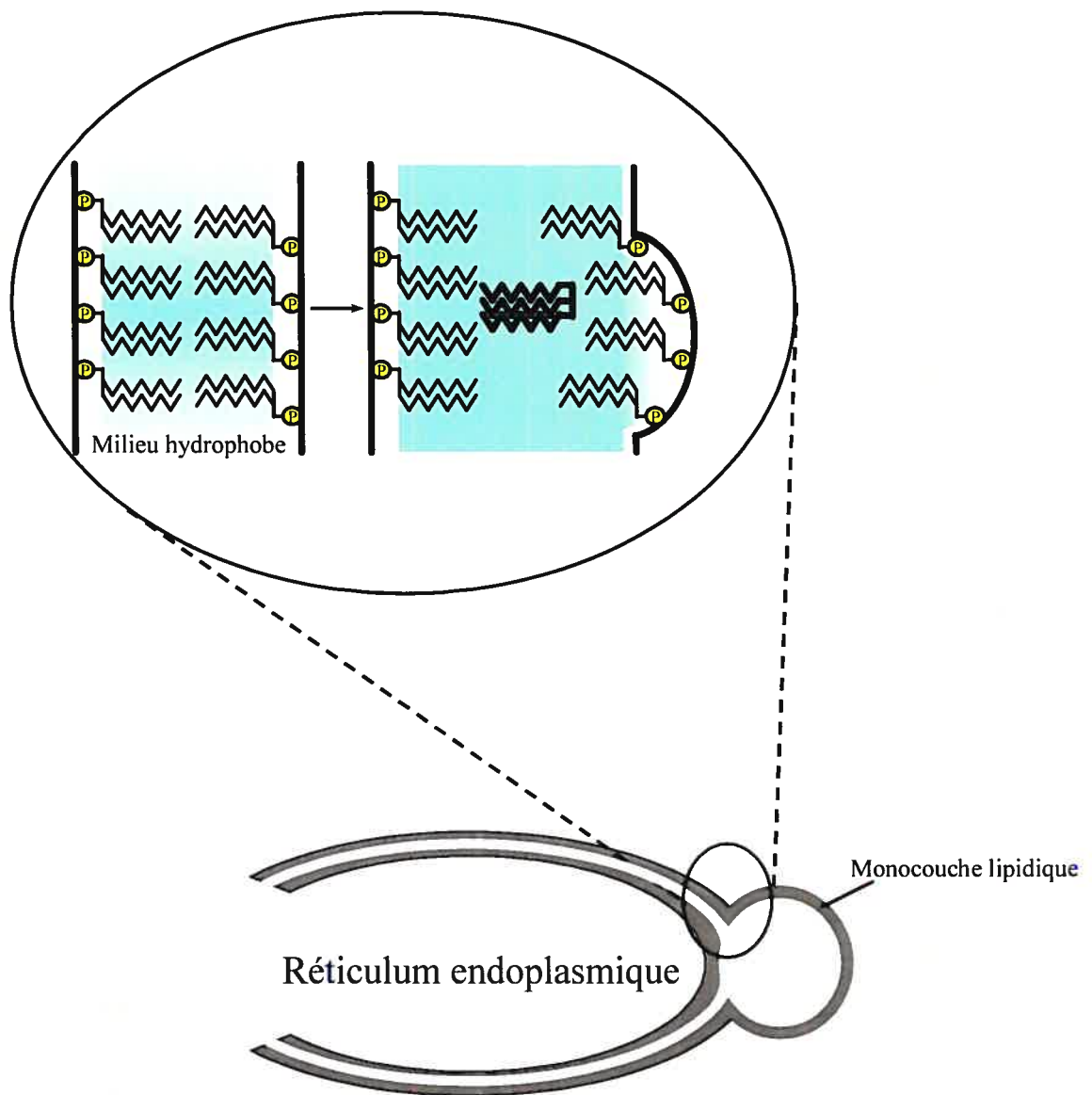


Figure 8 Hypothèse du bourgeonnement de la gouttelette lipidique à partir du réticulum endoplasmique.

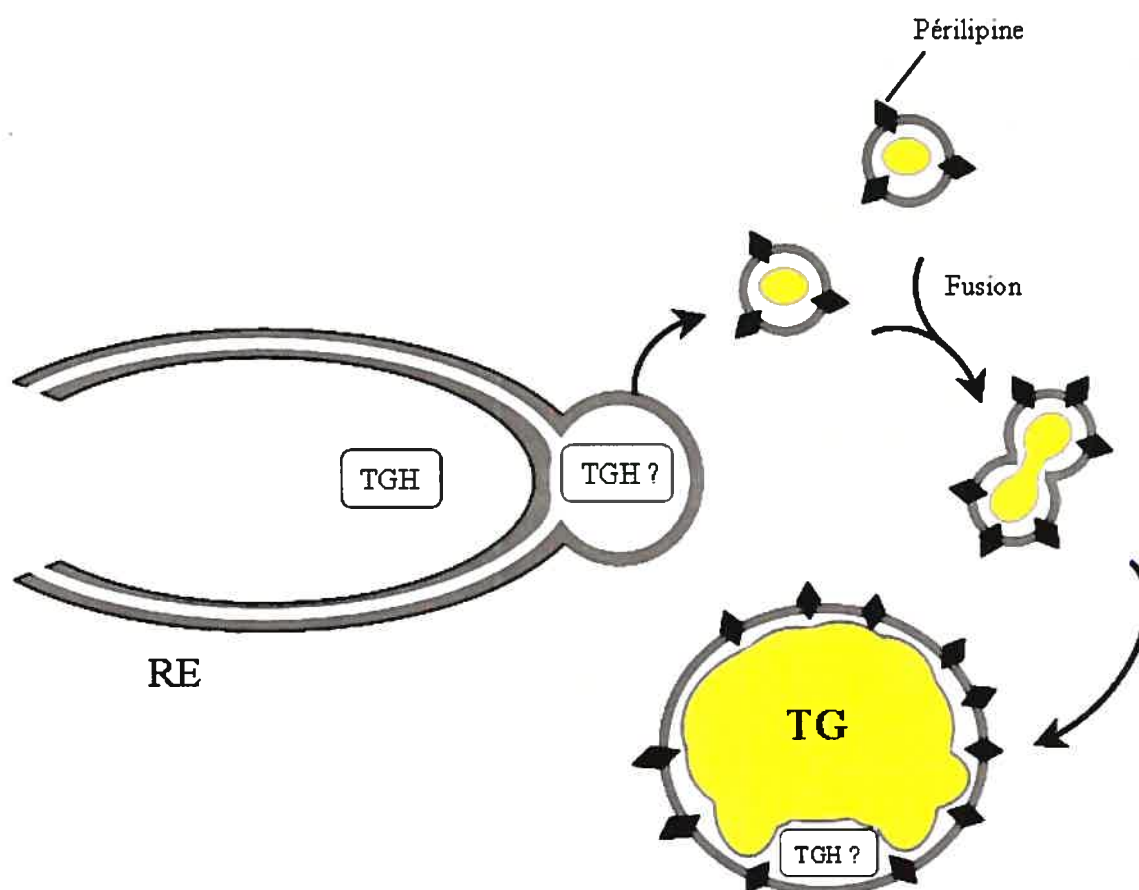


Figure 9 Théorie de l'assemblage des gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique (RE).

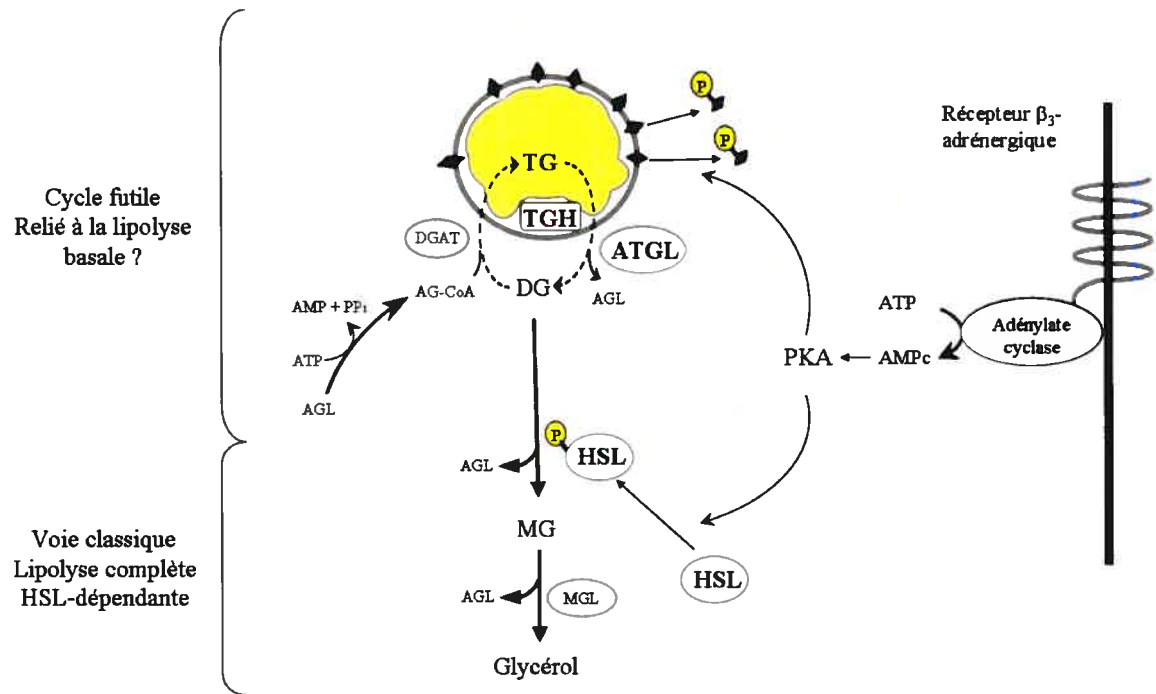


Figure 10 Hypothèse d'un mécanisme pour les lipolyses médiées par la TGH.

L'objectif de ce projet est de mettre au point et d'étudier les cellules adipocytaires en culture afin d'explorer le rôle des lipases et des autres composantes de l'appareil lipolytique dans l'espoir d'apporter une contribution à l'avancement de la recherche sur l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type II.

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 MATÉRIEL

Tous les milieux, sérum, antibiotiques et autres produits utilisés pour la culture cellulaire proviennent de Gibco-Invitrogen, sauf les exceptions suivantes : l'IBMX, le dexaméthasone, l'insuline, le TNF- α , la cycloheximide et l'actinomycine D ont été obtenus de Sigma-Aldrich. Le rosiglitazone provient de Cayman Chemical. Toutes les enzymes utilisées pour les réactions de PCR ainsi que pour la construction des plasmides proviennent de Invitrogen. Toutes les enzymes utilisées pour le dosage du glycérol en plus du DTT, du NAD, de l'ATP et du BSA (sans acides gras) ont été obtenus de Roche Diagnostics. Tous les autres produits chimiques proviennent de Sigma, sauf indication contraire.

2.2 CULTURE PRIMAIRE DE FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES DE SOURIS

Les cellules primaires de fibroblastes embryonnaires ont été préparées à partir d'embryons issus de croisements entre souris LHS+/- mâles et LHS-/- femelles. Ces dernières sont sacrifiées après 13,5 jours de gestation (Harvey et al., 1993). Séparément, les embryons sont prélevés et lavés deux fois avec du tampon PBS pH 7.2 stérile (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄). Ils sont introduits au travers d'une seringue 1 cc avec aiguille de 18 gauge et immédiatement mis en culture dans des pétris 100 mm prétraités avec 1 % gélatine. Pour ces cellules, le milieu de maintenance consiste en un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle*) qui est riche en glucose (4,5 mg/L) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) ainsi que 10 000 unités/mL de pénicilline G et 10 000 μ g/mL de streptomycine. La culture se fait à 37 °C en présence de 10 % CO₂ dans un incubateur

humidifié. Le milieu est renouvelé chaque deux ou trois jours.

2.3 ISOLATION DE L'ADN

Chaque lignée de cellules primaires provient d'un unique embryon. Pour distinguer les lignées hétérozygotes de celles déficientes en LHS, chaque lignée est génotypée. L'ADN est extrait des cellules à l'aide de la trousse PUREGENE™ (Gentra systems) selon les instructions du manufacturier. L'ADN est quantifié à l'aide de la trousse PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes) selon le protocole du fournisseur.

2.4 GÉNOTYPAGE

Environ 1 µg d'ADN est mis en présence de trois différentes amorces (Tableau II). L'amorce LipM32 (11 ng/µL) et l'amorce LipM27 (10 ng/µL) s'hybrident avec la séquence du gène de la LHS endogène. L'amorce LacZ3 (11 ng/µL) quand à elle, s'hybride avec la séquence du gène de la bêta-galactosidase inséré lors de l'invalidation de LHS (Wang et al., 2001). Au mélange d'ADN et d'amorces sont également ajoutés dNTP, polymérase Taq et tampon de PCR. Ce dernier est composé de 100 mM Tris pH 8,8; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01 % gélatine; 5 % DMSO. Les 40 cycles d'amplification comprennent une étape de dénaturation (45 secondes, 94 °C), d'hybridation (45 secondes, 60 °C) et d'élongation (90 secondes, 72 °C).

2.5 DIFFÉRENCIATION DES CELLULES FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES EN CULTURE

Les fibroblastes embryonnaires de passage 2 à 4 sont mis en culture dans le milieu de maintenance jusqu'à deux jours après confluence. Le milieu est alors renouvelé avec

du milieu de différenciation qui contient, en plus des antibiotiques, du DMEM 10 % SVF, 500 μ M IBMX, 1 μ M dexaméthasone, 5 μ g/mL insuline (1,62 μ moles/L), 1 μ M rosiglitazone. Ce milieu est renouvelé à chaque deux ou trois jours pour induire la différenciation adipocytaire.

2.6 CULTURE ET DIFFÉRENCIATION DES PRÉADIPOCYTES NIH 3T3-F442A

Les cellules préadipocytaires NIH 3T3-F442A ont été obtenues du Dr. K. Easley (Harvard Medical School, Boston). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM enrichi avec 5 % (v/v) SVF, 10 000 unités/mL de pénicilline G et 10 000 μ g/mL de streptomycine dans un incubateur humidifié à 37 °C et 10 % CO₂. Pour induire leur différenciation, elles sont cultivées dans ce milieu jusqu'à deux jours après confluence. Le milieu est alors remplacé par du milieu DMEM 10 % (v/v) SVF, 5 μ g/mL insuline. La différenciation adipocytaires se caractérise entre autres par l'accumulation de gouttelettes lipidiques à l'intérieur de ces cellules. Le pourcentage de différenciation des cellules est évaluée d'abord visuellement, par microscopie en contraste de phase. L'accumulation des lipides à l'intérieur des gouttelettes est également confirmée par coloration à l'Huile Rouge (section 2.7). Comme expliqué dans la section résultats, la différenciation terminale des cellules est quant à elle confirmée par mesure d'ARN messagers adipocytaires, par la détection de protéines adipocytaires ainsi que par dosage de l'activité lipolytique.

Amorce	Séquence 5'→3'
LipM32	AGGCAGGAGAATGGAACAGT
LipM27	AGCGGTGAGTCCTTCATCAC
LacZ3	GAGAGTATCGGCCTCAGGAAGA

Tableau II Amorces utilisées pour le génotypage

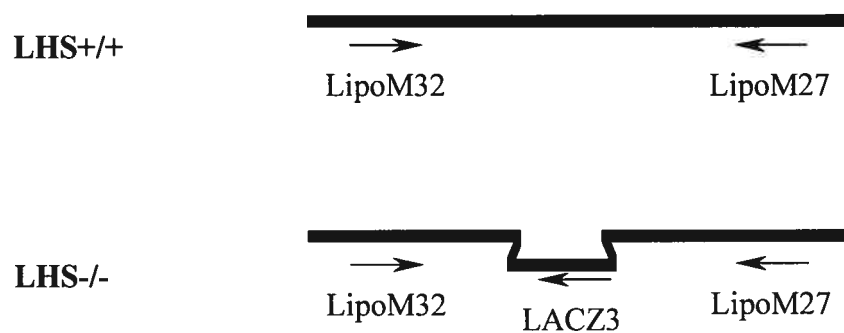


Figure 11 Schéma de l'organisation des amorces pour le génotypage

Amorce	Sense (5'→3')	Antisens (3'→5')
β-actine	ACGTTGACATCCGTAAAGACCT	GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC
HSL	TGAGATGGTAACTGTGAGCC	ACTGAGATTGAGGTGCTGTC
TGH	ATGAACACAGTCGGGGAAAC	ACCTCCTGCTGACTCTCCAA
ATGL	TATCCGGTGGATGAAAGAGC	TATCCGGTGGATGAAAGAGC
PPARγ	ACCACTCGCATTCCTTTGAC	TGGGTCAGCTCTTGTGAATG
DGAT1	TTCCGGCCTCTGGGCAIT	AGAATCGGCCCACAAATCCA
PEPCK	CTGGCACCTCAGTGAAGACA	TCGATGCCCTTCCCAGTAAAC
Pénilipine	GGAGAACGTGCTCAGAGAGG	GATGGTGTTCGCGAGAGTGT
Leptine	TCTCCGAGACCTCCTCCATCT	TTCCAGGACGCCATCCAG
Adiponectine	TGTTGGAAATGACAGGAGCTGAA	CACACTGAACGCTGAGCGATAC
GAPDH	CACTCTTCCACCTTCGATGC	CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT

Tableau III Amorces utilisées pour la quantification de l'ARNm par PCR en temps réel.

2.7 COLORATION À L'HUILE ROUGE

L'Huile Rouge est utilisée comme marqueur des lipides et permet donc de visualiser leur accumulation et la formation des gouttelettes dans les adipocytes différenciés en culture (Ramirez-Zacarias et al., 1992). Les cellules sont d'abord lavées deux fois avec du tampon PBS puis fixées avec 10 % (v/v) formaldéhyde durant deux heures. Elles sont ensuite lavées une seconde fois avec le tampon PBS puis incubées dans 0,3 % (v/v) d'Huile Rouge durant deux heures. La solution d'Huile Rouge est alors retirée et les cellules sont exposées à 60 % isopropanol pour 5 à 10 minutes. Les cellules sont finalement lavées (PBS) et visualisées au microscope à contraste de phase.

2.8 ISOLATION DE L'ARN ET QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS RÉEL

Afin de quantifier le niveau d'un ARN messager d'intérêt, une réaction de polymérase en chaîne (PCR) en temps réel est utilisée (Shitara et al., 2004). Tout d'abord, l'ARN total est extrait à partir d'environ 1×10^6 cellules à l'aide du produit Trizol[®] (Gibco-Invitrogen) selon le protocole du manufacturier. 10 µg d'ARN sont convertis en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse SuperScript[™] II (Gibco-Invitrogen) à l'aide de l'amorce dT en présence de dNTP, de DTT (dithiothreitol) et du tampon commercial 1st strand 5X Buffer (Gibco-Invitrogen). La synthèse de l'ADNc se fait à 42 °C pendant 30 min. Le mélange est ensuite incubé à 95 °C pendant 7 minutes.

La quantification de l'ARNm est effectuée dans un appareil Smart Cycler (Cepheid) à l'aide du réactif CYBR[®] Green I (Qiagen) selon le protocole du manufacturier. 1 µL d'ADNc est mis en présence d'amorces spécifiques (Tableau III) dans des conditions

de PCR optimisées à 15 secondes à 94 °C, 20 secondes à 60 °C et 20 secondes à 72 °C. La réaction se fait en 45 cycles d'amplification. Les amorces ont été choisies à l'aide du programme informatique Primer3 Input (primer3_www.cgi v 0.2). Les données sont présentées en valeurs absolues de fluorescence SYBR Green par µg d'ARN.

2.9 LIPOLYSE

Les cellules 3T3-F442A ainsi que les fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- sont cultivés et différenciés dans des plaques à 6 puits en présence de leur milieu respectif. Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon phosphate (PBS) et incubées toute la nuit en présence de DMEM 4 % BSA (*Bovine serum albumin*) sans acides gras. Le matin suivant, les cellules sont mises en présence des divers agents lipolytiques comme décrit dans la section résultats, et ce, en présence de DMEM 4 % BSA frais. Des aliquots sont prélevés à différents temps pour le dosage du glycérol. Les cellules sont récupérées à la fin de l'expérience pour en extraire l'ADN.

2.10 DOSAGE DU GLYCÉROL

Le glycérol libéré par les cellules est quantifié suivant une technique de luminométrie adaptée de Kather et al. (1982). Cette technique se base essentiellement sur le principe de la détection de la bioluminescence. Tout d'abord, le glycérol est transformé en glycérol 3-phosphate par l'enzyme glycérol kinase. Il est ensuite converti en dihydroxyacétone 3-phosphate par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase. À cette étape, une première molécule de NADH est produite. L'enzyme triosephosphate isomérase transforme le dihydroxyacétone 3-phosphate en glycéraldéhyde 3-phosphate. Ce dernier est converti en glycérate 3-phosphate par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase. Une seconde molécule de NADH est

alors produite. Le NADH est ainsi produit de façon proportionnelle à la quantité de glycérol présente dans le milieu. Cette première partie de la cascade de réaction se fait en une heure à 37 °C en présence d'un tampon constitué de 28,7 mM triéthanolamine; 1,1 mM dithiothreitol (DTT); 8 mM NAD; 1,5 mM ATP en plus de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (19 U/mL), de la glycérol kinase (6 U/mL), de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (2,4 U/mL) et de la triosephosphate isomérase (40 U/mL). Cette première chaîne de réactions est arrêtée en remettant les échantillons sur glace puis en les diluant (5 X) avec une solution de raffinose pH 7 (67,3 mM raffinose; 0,4 mM DTT; 200 mM phosphate de potassium), toujours à 4 °C.

50 µL du mélange final sont transférés dans un puit d'une plaque de 96 puits. La plaque est lue par un luminomètre Mithras après injection de 200 µL d'une solution contenant 114,2 mM phosphate de potassium; 38,4 mM raffinose; 0,23 mM DTT; 0,14 % triton X 100; 0,7 % BSA sans acides gras; 0,5 mM tétradécanal; 0,11 U/mL luciférase; 0,06 U/mL NAD(P)H:FMN oxydoréductase et 1 µM flavine mononucléotide (FMN). Lors de cette seconde cascade de réaction, les molécules de NADH produites s'oxydent en NAD en parallèle avec la réduction du FMN en FMNH₂ grâce à la NADH:FMN oxydoréductase. Avec le tétradécanal, la luciférase oxyde le FMNH₂ en FMN en produisant de la lumière dont l'émission est détectée par le luminomètre. Grâce à une courbe standard faite avec des concentrations connues de glycérol, la luminescence peut être quantifiée et rapportée en glycérol libéré par les cellules.

2.11 EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES LIPIDES

Extraction

Les cellules 3T3-F442A sont cultivées et différenciées dans des pétris 10 cm² en présence de leur milieu respectif. Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon phosphate (PBS) et récupérées dans environ 1 mL de PBS. Le contenu cellulaire est récupéré par homogénéisation au potter et mis en présence de chloroforme : méthanol (2 : 1) et d'une solution saline (NaCl 145 mM) pour une heure avec agitation. Une couche contenant les lipides en présence du chloroforme est ensuite récupérée par centrifugation à 24 °C. Le chloroforme est alors évaporé sous jet d'azote. Les lipides sont dissous dans du chloroforme : méthanol (2 : 1) et entreposés à - 20 °C pour l'analyse par chromatographie sur couche mince.

Chromatographie sur couche mince et quantification des lipides

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange sur une matrice de silice (Dobiasova, 1963). Les lipides migrent dans un mélange hexane : éther : acide acétique (80 : 20 : 3) qui constitue l'éluant. Les différents composants lipidiques (TG, DG, MG, etc.) ainsi séparés sont visualisés sous vapeurs d'iode et récupérés dans une colonne pour être détachés de la matrice à l'aide d'une solution de chloroforme : méthanol (2 : 1). Le chloroforme : méthanol est évaporé sous jet d'azote et les lipides sont dissous dans 50 à 300 µL de chloroforme : méthanol (2 : 1). Les triglycérides et les diglycérides ainsi extraits sont quantifiés à l'aide de la trousse Triglyceride GPO-PAP (Roche diagnostics) selon les instructions du fournisseur.

2.12 DOSAGE DE LA LEPTINE

La quantité de leptine sécrétée a été dosée par Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) à l'aide de la trousse Quantikine[®] M MURINE (R&D Systems, Inc.), selon le manuel du fournisseur (Engvall et Perlman, 1971). Des microplaques tapissées d'anticorps polyclonaux spécifiques à la leptine de souris sont utilisées. Tout d'abord, la leptine présente dans le milieu cellulaire se lie à cet anticorps fixe. Ensuite, un second anticorps polyclonal est ajouté. Il est également spécifique pour la leptine de souris mais il est couplé à une enzyme. L'ajout du substrat de cette enzyme dans ces microplaques donne lieu à une réaction enzymatique traduite par une couleur bleue. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité de leptine présente dans l'échantillon d'intérêt et elle est quantifiable à l'aide d'un spectrophotomètre.

2.13 DOSAGE DE L'ADIPONECTINE

Le niveau de sécrétion de l'adiponectine est quantifié par essai radio-immunologiques à l'aide de la trousse Mouse Adiponectin Ria Kit (Linco Research, Inc.). Une concentration fixe de l'antigène traceur marqué Adiponectine-I¹²⁵ est mise en présence de différentes dilutions d'anticorps spécifique à l'adiponectine de sorte que les sites de liaison de l'antigène marqué à l'anticorps se trouvent être limités. Ainsi, lorsqu'un antigène non marqué est ajouté (adiponectine provenant du milieu de culture), il y a compétition pour les sites de liaisons. La quantité de traceur radiomarqué est alors inversement proportionnelle à la quantité d'adiponectine non marquée se trouvant dans l'échantillon de mesure.

2.14 IMMUNOBUVARDAGE

Les cellules sont lavées deux fois avec le tampon PBS et grattées pour être récupérées dans du tampon d'homogénéisation composé de 0,25 M sucrose; 1 mM EDTA; 10 mM Tris pH 7; 1 mM DTE (1,4-Dithiothreitol); 20 µg/mL Leupeptine; 2 µg/mL Antipain; 1 µg/mL Pepstatin. Elles sont homogénéisées à l'aide d'un polytron et centrifugées à 12 000 g, 10 min, 4 °C. Les protéines contenues dans l'infranageant sont récupérées et conservées à - 80 °C. Pour les protéines provenant du tissu adipeux et celles du foie, la procédure d'homogénéisation est la même que celle pour les cellules.

La concentration des protéines ainsi extraites est quantifiée à l'aide de la trousse DC protein assay (BioRad). Les protéines sont dissoutes dans un volume égal de tampon SDS (Sodium dodecyl sulfate) 2X (1 % SDS; 0,2 M DTT; 0,02 % bleu de bromophénol) et bouillies 8 minutes avant d'être chargées sur un gel 10 % acrylamide 29 : 1. Les protéines migrent sous un voltage d'environ 100 V durant 2 à 3 heures en présence du tampon de migration (125 mM Tris; 1,25 M glycine; 0,05 % SDS). Elles sont par la suite transférées sur membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) (Millipore, Nepean) en présence du tampon de transfert (40 mM glycine; 48 mM Tris; 0,37 % SDS; 20 % méthanol) sous un voltage de 100 V durant 1 heure à 4 °C.

La membrane est lavée 3 fois 10 min dans du tampon PBST (PBS 1X; 0,1 % Tween 20) puis incubée une heure en présence de la solution de blocage contenant PBST 4 % lait déshydraté. La membrane est ensuite de nouveau lavée avec le tampon PBST puis incubée durant une heure en présence du premier anticorps anti-HSL (1 : 5000 v/v), anti-TGH (1 : 2500 v/v), anti-ATGL (1 : 200) ou alors anti-périlipine (1 : 2500) selon le cas, et ce, en présence de la solution de blocage. La membrane est ensuite lavée et incubée avec le second anticorps anti-lapin (1 : 10 000 v/v) pendant une

heure. Finalement, après lavage, le second anticorps est détecté à l'aide de la trousse Immobilon™ Western (Millipore).

2.15 INTERFÉRENCE À L'ARN

L'interférence à l'ARN est une technique qui permet une inhibition rapide, mais partielle de la traduction d'une protéine cible. Elle offre ainsi l'avantage d'étudier la fonction d'un ou de plusieurs gènes à la fois, et ce, *in vitro* comme *in vivo* (Takahiko et Constance, 2003). Il s'agit d'un mécanisme naturel impliqué dans la défense cellulaire contre certaines infections virales, initialement mis en évidence chez les plantes et caractérisé chez le nématode *Coenorhabditis elegans* (Wilkins et al., 2005).

S'il y a présence de molécules d'ARN double brins dans la cellule, ils sont fragmentés en petits duplexes d'ARN interférents (siRNA : *small interfering RNA*) d'environ 19 à 21 nucléotides par une RNase III appelée Dicer (figure 11). Ceci induit la formation du complexe Risc (*RNA-induced silencing complex*) qui clive alors toute séquence d'ARNm homologue à celle des siRNA se trouvant ailleurs dans le génome de la cellule (Tijsterman et Plasterk, 2004).

Construction du plasmide pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH

Le vecteur pSilencer™ 3.1-H1.hygro a été obtenu du Dr. Yu Zhenbao (figure 12). Le choix des quatre amorces (siTGH1, siTGH2, siTGH3 et siTGH4) pour la construction du plasmide a été fait à l'aide de l'outil informatique siDesign Center conçu par Dharmacon (www.dharmacon.com/sidesign). L'absence d'homologies possibles avec d'autres protéines parmi les gènes de la souris a été vérifiée à l'aide de ce même programme. La séquence de chacune des amorces choisies pour cibler la protéine

TGH est présentée sur le tableau IV. Des bouts cohésifs ont été ajoutés de part et d'autre de ces amorces pour pouvoir être insérées dans le vecteur pSilencer™ 3.1-H1.hygro selon les spécifications du manufacturier (Ambion).

Chacune de ces amorces a été hybridée avec sa séquence complémentaire en chauffant à 70 °C puis en refroidissant graduellement jusqu'à la température ambiante (environ 25 °C). Les amorces double brins ainsi formées sont ensuite insérées dans le vecteur pSilencer™ 3.1-H1.hygro à l'aide de la T4 DNA ligase (16 °C, toute la nuit).

Des bactéries compétentes DH5- α (Invitrogen) ont été transformées avec les plasmides pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH1, pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH2, pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH3 et pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH4 résultants. Ceci a été fait par choc thermique (30 minutes à 4 °C, 2 minutes à 42°C et puis 3 minutes à 4 °C). Les bactéries sont incubées toute la nuit à 37 °C dans des pétris 100 mm sur du milieu LB-AGAR sous sélection à l'ampicilline (100 μ g/mL) (Sigma). Cinq clones de chaque transformation ont été prélevés et incubés environ 8 heures en présence de 3 mL de milieu LB-AGAR 100 μ g/mL ampicilline à 37 °C. Les bactéries sont ensuite transférées dans 50 mL de milieu LB-AGAR 100 μ g/mL ampicilline et incubées toute la nuit à 37 °C. Les plasmides sont extraits et purifiés à l'aide de la trousse QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen). Les plasmides ont été séquencés par le service de biotechnologie du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine. La séquence des plasmides pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH1, pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH2 et pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH3 a été donc confirmée. Le plasmide pSilencer™ 3.1-H1.hygro.siTGH4, quant à lui, n'a pas pu être correctement séquencé et n'a donc pas été par la suite utilisé.

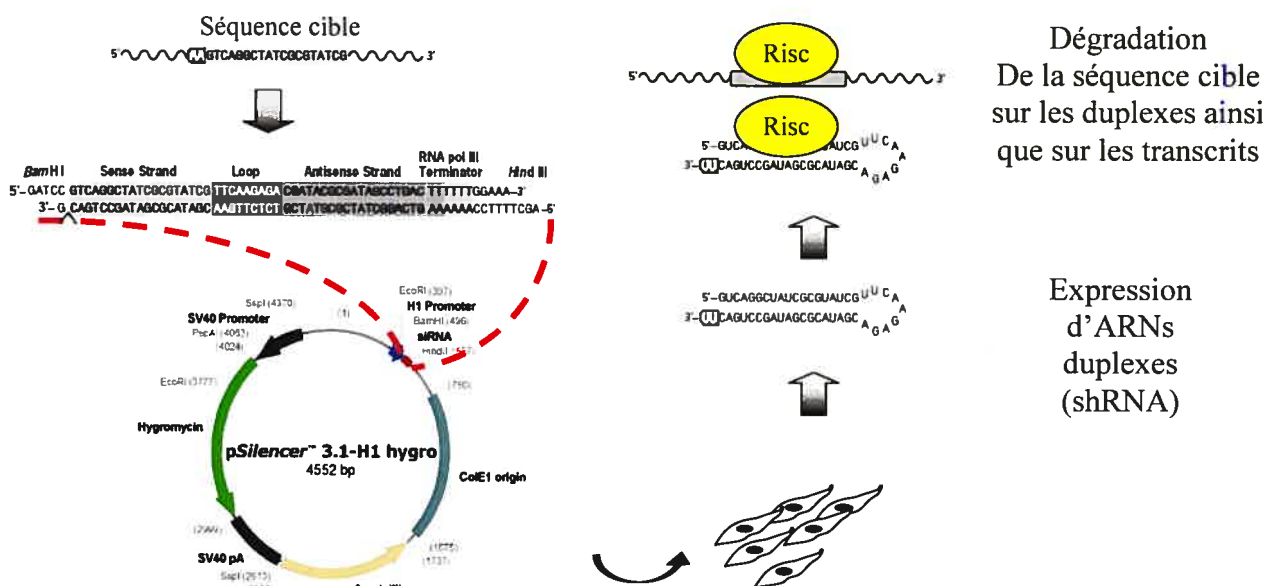


Figure 12 Principe de l'interférence à l'ARN et vecteur utilisé pour la construction des plasmides siTGH, siHSL et siATGL.

Construction du plasmide pSilencer™ 3.1-H1.neo.siHSL et pSilencer™ 3.1-H1.puro.siATGL :

Les plasmides pSilencer™ 3.1-H1.neo.siHSL et pSilencer™ 3.1-H1.puro.siATGL ciblant les lipases LHS et et ATGL respectivement ont été construits selon le même protocole décrit ci haut pour TGH. Les vecteurs pSilencer™ 3.1-H1.neo et pSilencer™ 3.1-H1.puro ont été toutefois achetés de la compagnie Ambion. Suite aux analyses de séquençage, seuls les plasmides relatifs aux clones siHSL1, siHSL4, siATGL1, siATGL2 ont été retenus pour la suite des expériences.

Transfection stable des cellules NIH 3T3-F442A

Les cellules sont transfectées de manière stable dans le but de maintenir l'expression des plasmides et donc pour obtenir une inhibition continue de la protéine cible par interférence à l'ARN. Pour cela, le plasmide introduit doit être linéarisé pour pouvoir s'intégrer dans le génome.

Les plasmides pSilencer™ 3.1-H1.hydro.siTGH1, pSilencer™ 3.1-H1.hydro.siTGH2 et pSilencer™ 3.1-H1.hydro.siTGH3 ont été linéarisés par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction HindIII à 37 °C toute la nuit. L'ADN est ensuite extrait au phénol/chloroforme pour éliminer toute trace d'enzyme.

$0,5 \times 10^6$ cellules NIH 3T3-F442A ont étéensemencées dans des flacons T-25 et cultivées jusqu'à 80 % confluence. Les cellules ont été par la suite transfectée à l'aide de la trousse de transfection Nucleofector® (AMAXA biosystems) suivant le protocole du manufacturier. Les cellules ainsi transfectées ont été par la suite sélectionnées en présence des antibiotiques respectifs hygromycine (pour les clones siTGH), néomycine (pour les clones siHSL) et puromycine (pour les clones siATGL).

Amorce	Séquence 5'→3'
siHSL1	TCCGTGCTATGGCCTACTA
siHSL2	GTATGTCACGCTACACAAA
siHSL3	GTGTGTCAGTGCCTATTCA
siHSL4	TGTGGCTTCTAACCGCAAA
siTGH1	AAACTGGACTTACTTGGAA
siTGH2	GAACACTGTTAAAGGCAAA
siTGH3	ACAGCAGACTACCAGTGAT
siTGH4	TGTGGTGAACACTGTTAAA
siATGL1	TGAAGCAGGTGCCAACATT
siATGL2	GAAGCAGGTGCCAACATTA
siATGL3	TTATTGAGGTGTCCAAGGA
siATGL4	ATCCGTGGCTGTCTACTAA

Tableau IV Amorces utilisées lors de la construction des plasmides pour les expériences d'interférence à l'ARN.

2.16 STATISTIQUES

Sauf indication contraire, les résultats sont exprimés en valeur moyenne \pm erreur standard. Les groupes ont été comparés au moyen du test de Student non-parié.

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

3.1 PRÉADIPOCYTES NIH 3T3-F442A

3.1.1 *Différenciation des cellules 3T3-F442A*

La différenciation des cellules préadipocytaires NIH 3T3-F442A a été optimisée pour obtenir la fraction de différenciation adipocytaire maximale qui soit reproductible et dans les meilleurs temps possibles. Pour cela, différentes conditions de culture ont été testées. Par exemple, une meilleure différenciation des cellules a été obtenue en présence de 10 % SVF (versus 5 %) et 90 % O₂ (versus 95 %). De plus, le prétraitement des pétris et flacons avec 0,1 % gélatine a permis une meilleure adhésion des cellules et une meilleure longévité des adipocytes. Le niveau de différenciation a été évalué, par visualisation au microscope. La figure 13 montre l'acquisition du phénotype adipocytaire des cellules 3T3-F442A suite à l'induction de la différenciation. La formation des gouttelettes et l'accumulation des lipides sont visualisées par coloration à l'huile rouge. De façon reproductible, le pourcentage de différenciation résultant de l'optimisation du protocole de différenciation est d'environ 80 à 90 % et il est atteint après 8 à 10 jours d'induction.

Pour valider notre système, les propriétés adipocytaires ont été caractérisées. Tout d'abord, le niveau de transcription des gènes a été quantifié par PCR en temps réel. Le tableau V met en évidence le changement de l'expression de quelques gènes adipocytaires suite à l'induction de la différenciation des cellules 3T3-F442A. La transcription des gènes des lipases LHS, TGH et ATGL est induite de 2,7 fois, $3,4 \times 10^4$ fois et $2,0 \times 10^2$ fois, respectivement. Ceci concorde avec l'induction d'autres gènes adipocytaires incluant entre autres la périlipine ($3,0 \times 10^2$ fois) et le DGAT1 ($5,6 \times 10^2$ fois). Le gène de la β -actine, quant à lui, subit comme attendu une suppression progressive tout au long de la différenciation (suppression de 2,5 fois) (tableau V). La concentration de protéines adipocytaires a également été évaluée directement par immunobuvardage des lysats cellulaires aux différents jours de différenciation (figure 14).

Par chromatographie sur couche mince, les niveaux de TG et de DG ont été évalués à 20,1 nmoles/ 10^6 cellules et 1,2 nmoles/ 10^6 cellules, respectivement pour un ratio DG/TG de 0,06. Dans le TABI, les niveaux de TG et de DG correspondent respectivement à 272 ± 43 nmoles/mg de gras et 8 ± 2 nmoles/mg de gras pour un ratio de $0,04 \pm 0,02$. La fonction lipolytique des cellules NIH 3T3-F442A différenciées a également été confirmée par dosage du glycérol libéré (figure 15 A). Pareillement, les cellules acquièrent une fonction endocrine comme démontré par le dosage du niveau de sécrétion de la leptine (figure 15 B).

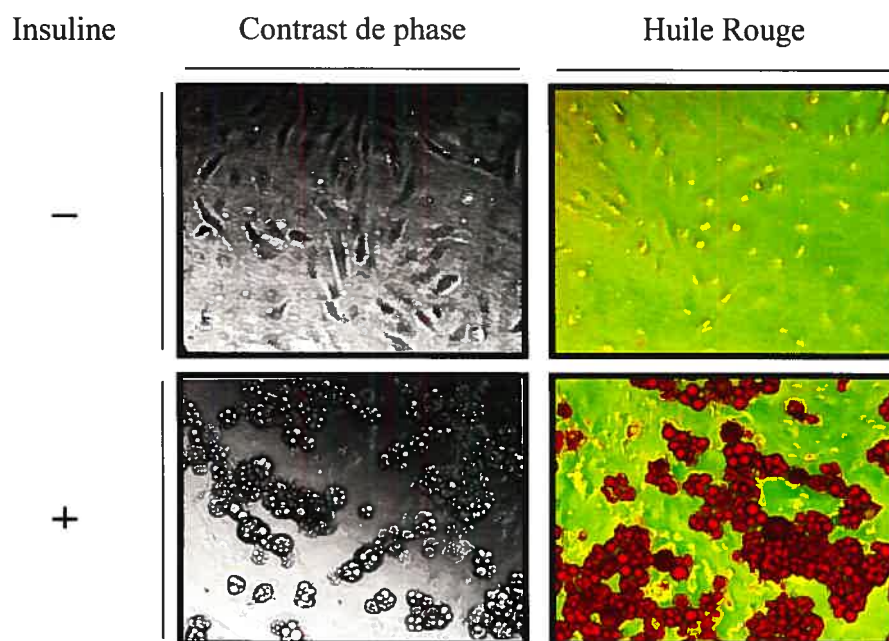


Figure 13 **Différenciation des cellules préadipocytaires NIH 3T3-F442A.** Les cellules ont été différenciées essentiellement par l'ajout de l'insuline. La formation des gouttelettes lipidiques a été mise en évidence par coloration des lipides à l'Huile Rouge.

Gène	ND	Différenciées	Changement après différenciation
LHS	$0,36 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,06$	$2,7 \uparrow$
TGH	$(6,0 \pm 0,4) * 10^{-5}$	$2,1 \pm 0,1$	$3,4 * 10^4 \uparrow$
ATGL	$0,0063 \pm 0,004$	$1,17 \pm 0,08$	$2,0 * 10^2 \uparrow$
Périlipine	$0,0023 \pm 0,0004$	$0,7 \pm 0,2$	$3,0 * 10^2 \uparrow$
DGAT1	$0,0027 \pm 0,0002$	$1,5 \pm 0,1$	$5,6 * 10^2 \uparrow$
PEPCK	$0,0035 \pm 0,0002$	$1,40 \pm 0,09$	$4,0 * 10^2 \uparrow$
Leptine	$1,5 \pm 0,8$	66 ± 49	$44 \uparrow$
GAPDH	$0,13 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,4$	$11 \uparrow$
β -actine	$0,39 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,04$	$2,5 \downarrow$

Tableau V Niveau d'induction de l'expression de quelques gènes adipocytaires dans les cellules 3T3-F442A non différenciées (ND) et différenciées.

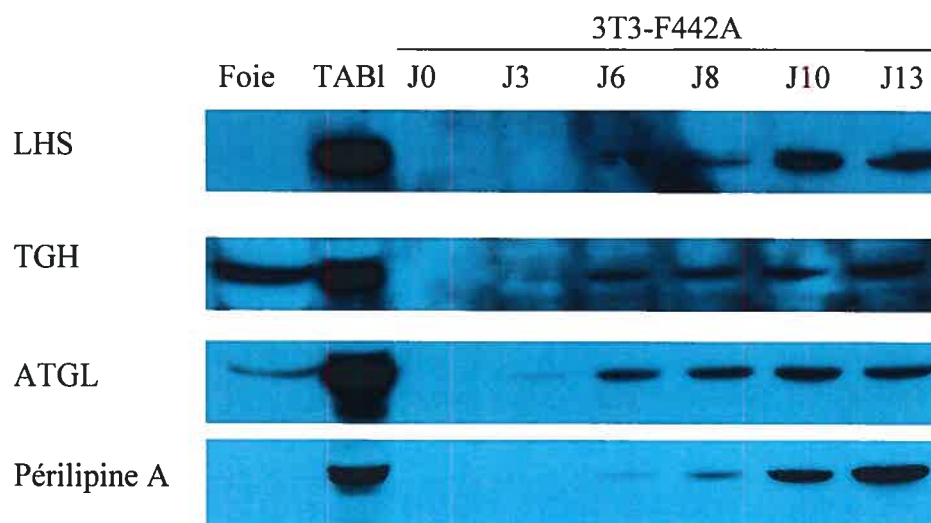


Figure 14 Expression de quelques protéines adipocytaires de la lipolyse au cours de la différenciation des cellules 3T3-F442A, en comparaison avec le foie et le tissu adipeux blanc (TABl). Les jours J0, J3, J6, J8, J10 et J13 correspondent aux jours suivant l'induction de la différenciation.

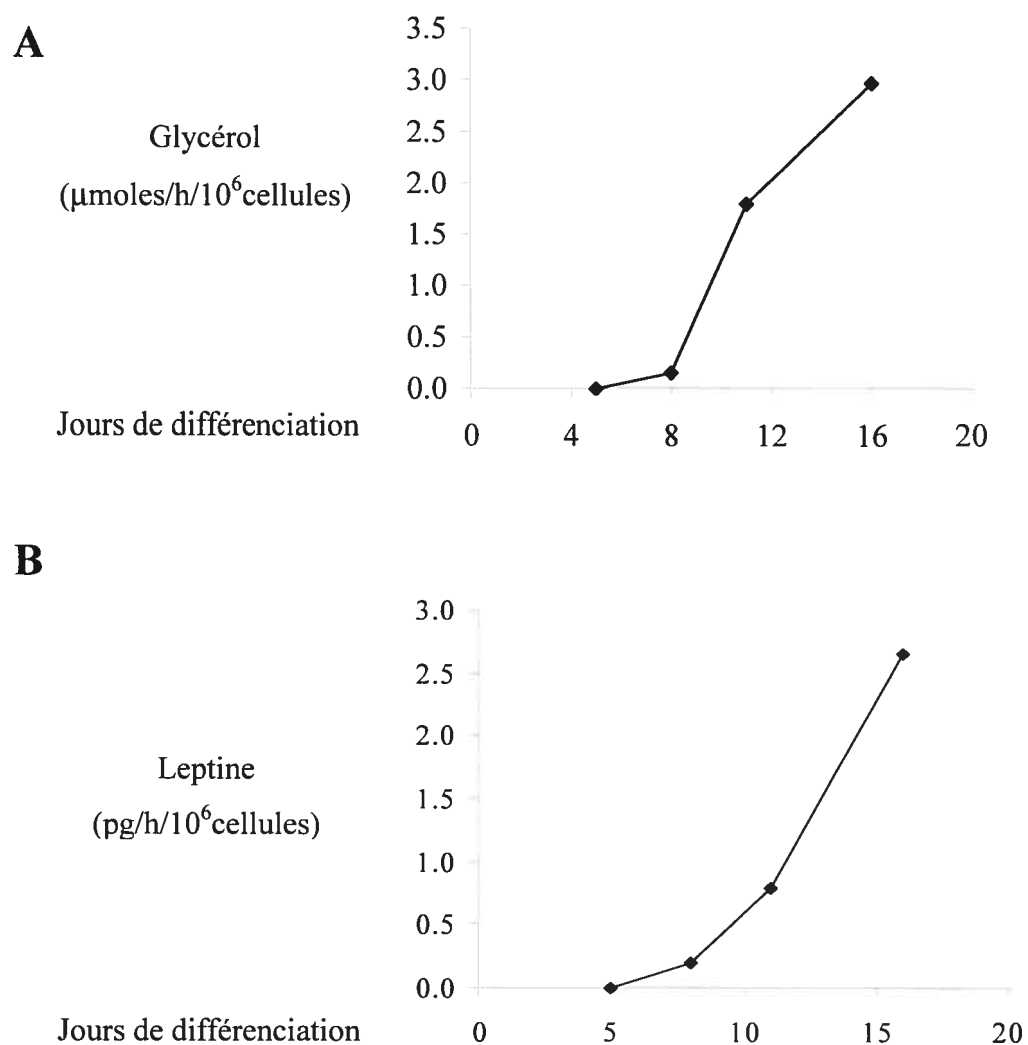


Figure 15 Acquisition de A) la fonction lipolytique et B) sécrétion de la leptine par les cellules 3T3-F442A au cours de la différenciation adipocytaire. Mesures prises après 24 heures.

3.1.2 Lipolyse dans les cellules 3T3-F442A différenciées

Pour établir les conditions optimales à l'activité lipolytique, les cellules ont été exposées à différentes conditions de culture. Par exemple, le sérum de veau fœtal est riche en facteurs comme l'insuline et qui ont un effet direct sur la libération du glycérol par les adipocytes. Cependant, l'absence du sérum dans le milieu de culture entraîne la mort des cellules après 12h d'incubation. Pour cela, 4 % de BSA a été ajouté au DMEM comme stabilisateur. Les essais de lipolyse effectués en présence du BSA montrent non seulement une meilleure survie des cellules, mais aussi le BSA n'interfère pas avec les prises de mesure des quantités de glycérol sécrétées. Quant à la lipolyse stimulée, cinq différentes concentrations d'agoniste β_3 -adrénergique (10 à 200 μM) ont été testées. Les résultats montrent que les cellules différenciées répondent à tout cet intervalle de concentration, mais qu'à une concentration de 100 μM , la lipolyse semblait être optimale (figure 16). Pareillement, deux concentrations de TNF- α ont été testées (figure 17). La concentration de TNF- α choisie est 10 ng/mL puisqu'elle donne une plus haute réponse lipolytique comparée à 100 ng/mL.

La figure 18 A montre la libération du glycérol par les cellules 3T3-F442A différenciées à différents temps d'incubation et à trois différentes conditions : basale, stimulée avec l'agoniste sélectif β_3 -adrénergique, le CL316,243, et stimulée au TNF- α (cytokine pro-inflammatoire). Ce profil lipolytique obtenu est reproductible dans les conditions optimisées, décrites précédemment. Les résultats montrent que la lipolyse stimulée par le ligand β_3 -adrénergique (CL316,243) suit une cinétique différente de celle basale et celle activée par le TNF- α . En effet, aux premières 60 minutes d'incubation, la quantité de glycérol libéré en réponse au CL316,243 ($0,26 \pm 0,02$ $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ ADN) est significativement plus élevée que celle à l'état basal ($0,025 \pm 0,007$ $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ ADN) et celle après induction par le TNF- α ($0,04 \pm 0,01$ $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ ADN). La vitesse de sécrétion du glycérol en réponse au CL316,243 diminue progressivement pour atteindre un taux de $0,0030 \pm 0,0005$ $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$

ADN/h à 24 heures. La lipolyse basale et celle stimulée au TNF- α atteignent leur vitesse maximale entre 0,5 et 2,0 heures d'incubation ($0,061 \pm 0,007$ $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ ADN/h pour le basal et $0,070 \pm 0,010$ $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ ADN/h en présence du TNF- α) (figure 18 B). Les résultats présentés à la figure 18 A montrent que la libération du glycérol est plus importante en présence du TNF- α qu'à l'état basal. Bien que cette augmentation ne soit pas statistiquement significative, elle est reproductible. De plus, cet écart entre la lipolyse basale et celle stimulée au TNF- α est de plus en plus important au cours du temps.

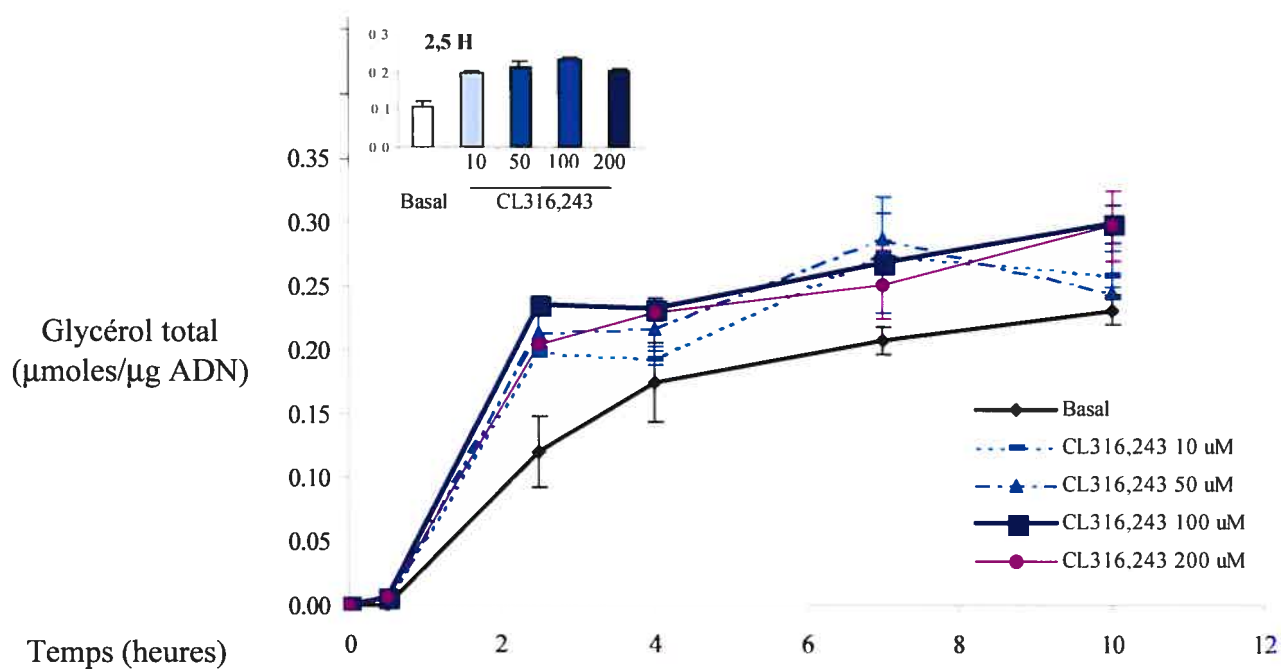


Figure 16 Optimisation de la concentration du ligand β_3 -adrénergique, CL316,243 pour la mesure de la lipolyse dans les cellules différenciées (n=4).

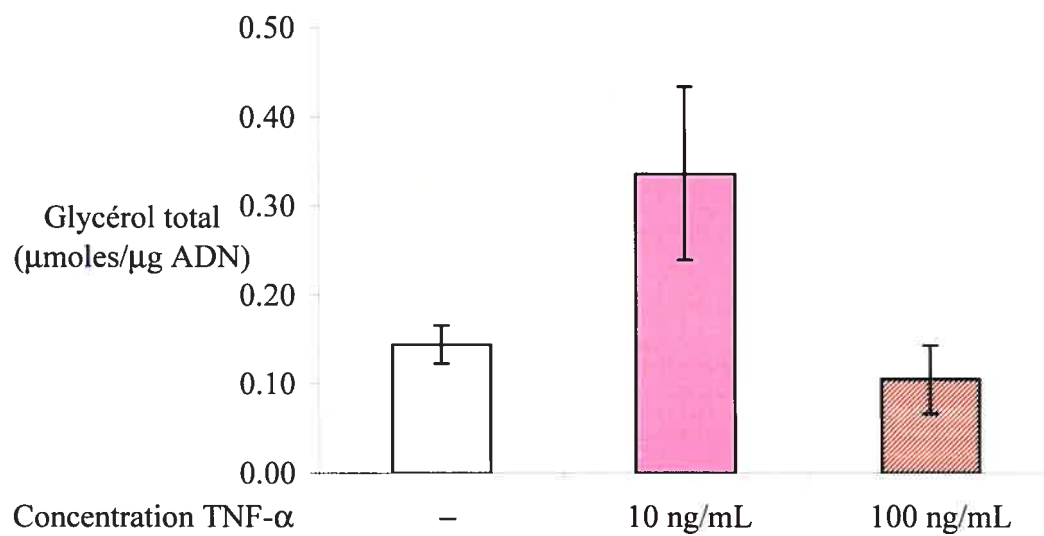


Figure 17 Optimisation de la concentration de $\text{TNF-}\alpha$ pour la mesure de la lipolyse dans les cellules différenciées (n=3).

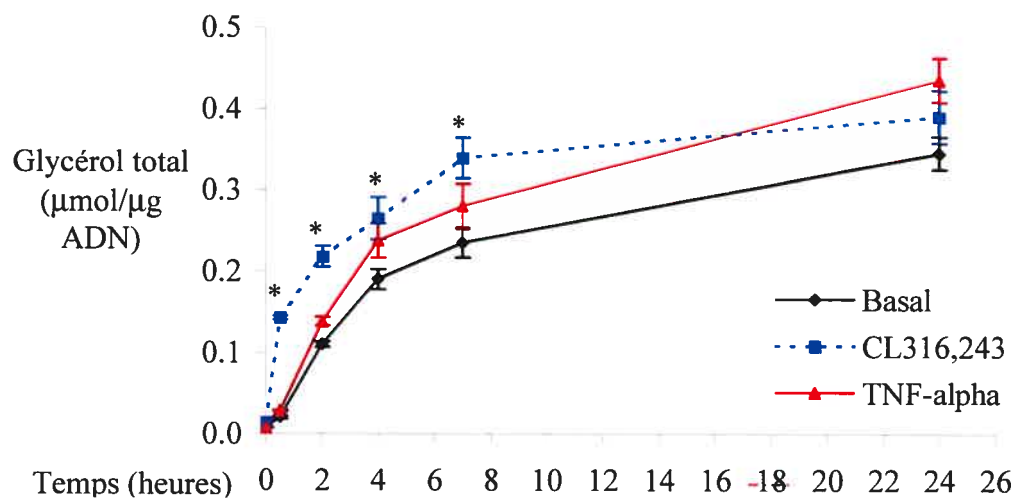
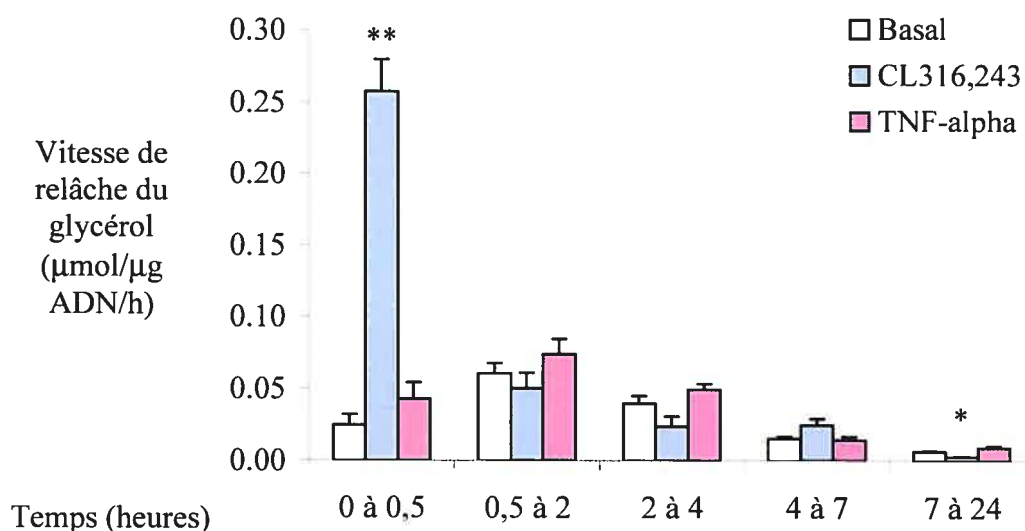
A**B**

Figure 18 La lipolyse dans les adipocytes 3T3-F442A. A) Quantité totale de glycérol libéré à l'état basal, stimulé par CL316,243 et stimulé par TNF- α , à différents temps d'incubation. B) Vitesse de relâche de glycérol selon les données en A (n=6). * $p \leq 0,01$ et ** $p \leq 0,0001$ vs basal.

3.2 FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES LHS+/+ ET LHS-/-

3.1.3 *Caractérisation de la différenciation des fibroblastes embryonnaires*

Le protocole de différenciation de la culture primaire de fibroblastes embryonnaires a été optimisé à partir du protocole de différenciation des préadipocytes NIH 3T3-F442A ainsi que des données disponibles dans la littérature. Les essais initiaux ont montré que bien qu'en présence de l'insuline, de l'IBMX et du dexaméthasone, la différenciation des lignées primaires est plus que trois fois plus longue que celles des préadipocytes 3T3-F442A (environ 30 jours vs 8 à 10 jours). De plus, suivant ce protocole, le pourcentage de différenciation était très variable entre les essais (figure 19).

Le rosiglitazone (1 μ M), un agoniste du facteur de transcription PPAR γ , a été ajouté au cocktail de différenciation. Les résultats montrent qu'en présence du rosiglitazone, le pourcentage de différenciation est amélioré, soit 70 % de différenciation par rapport à environ 30 % en son absence (figure 20 A). Bien que les résultats de lipolyse montrent que le rosiglitazone n'a pas d'effet direct sur la lipolyse (figure 20 B), il est retiré du milieu au moins 24 heures avant les essais de lipolyse sur ces cellules. Cela dit, ces observations démontrent la capacité des cellules à se différencier malgré l'absence de la LHS (figure 21).

Tout comme pour les cellules 3T3-F442A, les fibroblastes embryonnaires différenciés en culture ont été testés pour leurs propriétés adipocytaires. D'abord, les niveaux de transcription des gènes spécifiquement adipocytaires ont été quantifiés par PCR en temps réel. Le tableau VI montre les résultats obtenus. Pour ce système, l'induction de la transcription des gènes adipocytaires est détectable. Toutefois, les niveaux d'ARNm d'intérêt mesurés après différenciation sont plus bas que ceux observés dans les cellules 3T3-F442A différenciées (tableau V). Cela dit, ces

observations concordent avec le moindre niveau de différenciation de ces cellules. D'ailleurs, ceci est également reflété par l'abondance du gène de la β -actine dans les cellules fibroblastes différenciées par rapport aux cellules 3T3-F442A différenciées.

Pour un pourcentage de différenciation semblable entre la lignée LHS+/+ et la lignée LHS -/- (figure 21), l'expression de la lipase hormono-sensible est indétectable dans les cellules LHS-/- différenciées. Dans ce même lysat de cellules, l'expression de la périlipine, quant à elle, semble être détectée au même niveau dans les deux lignées, ce qui reflète un pourcentage de différenciation similaire entre les cellules LHS+/+ et LHS-/- (figure 22).

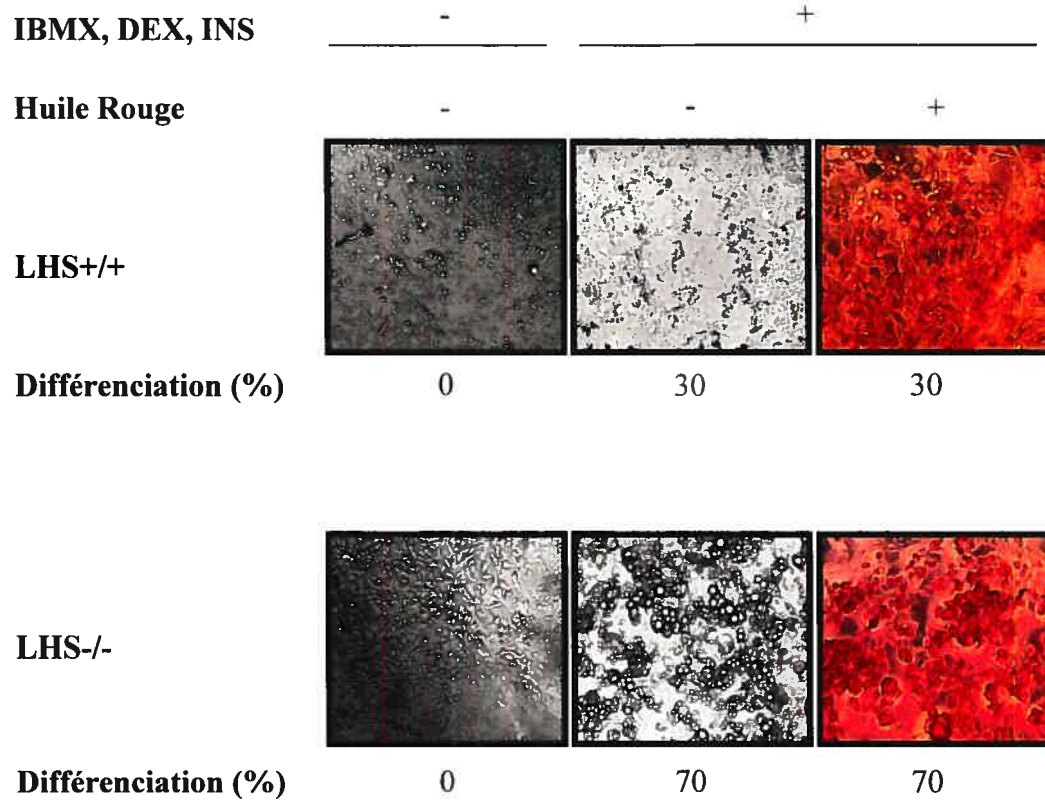
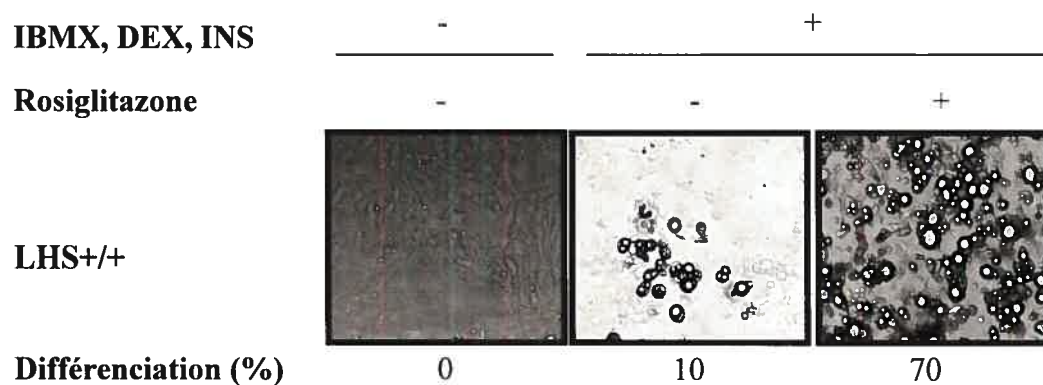


Figure 19 Différenciation des fibroblastes embryonnaires normales (LHS+/+) et déficientes en lipase hormono-sensible (LHS-/-). La formation des gouttelettes lipidiques a été mise en évidence par coloration des lipides à l'Huile Rouge.

A)



B)

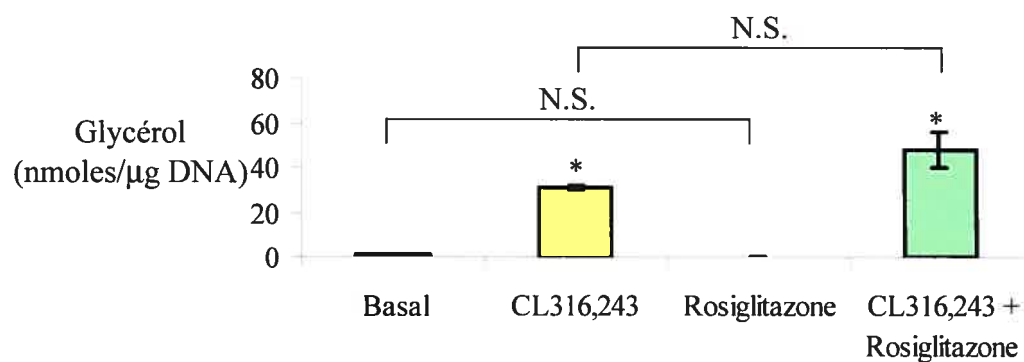


Figure 20 Effet du rosiglitazone sur A) la différenciation et B) la lipolyse dans les fibroblastes embryonnaires normales (LHS+/+). Pour le dosage du glycérol, toutes les cellules ont été différenciées à l'aide du rosiglitazone et mises par la suite en présence et/ou en absence du CL316,243 (100 μM) et du rosiglitazone (10 μM) pour une heure * $p < 0.05$ vs basal, N.S. : non significatif (n=3).

Fibroblastes embryonnaires		
Gène	LHS +/+	LHS -/-
LHS	1,4 ± 0,3	0,02 ± 0,01*
TGH	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2
ATGL	0,4 ± 0,4	0,7 ± 0,3
Pérlipine	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,2
DGAT1	1,6 ± 0,9	2,0 ± 1,0
PEPCK	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,9
β-actine	1,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
GAPDH	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1

Tableau VI Profil d'expression d'ARNm adipocytaires dans les fibroblastes embryonnaires normaux (LHS+/+) et déficients en LHS (LHS-/-) après différenciation. n=3, *p<0,05 vs LHS+/+.

3.1.4 Lipolyse dans les cellules fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- différenciées

La figure 23 montre les résultats de lipolyse dans les fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- à chacun des états : basal, stimulé au CL316,243 et stimulé au TNF- α après une période de 24 heures d'incubation. Une lipolyse basale est détectée en absence de la LHS, soit $0,05 \pm 0,01$ μ moles/ μ g ADN. Statistiquement, elle n'est pas différente de la lipolyse quantifiée dans les fibroblastes de génotype normal (LHS+/+), soit $0,06 \pm 0,02$ μ moles/ μ g ADN. La réponse à l'agoniste β_3 -adrénergique (CL316,243) est quant à elle réduite d'environ 30 % dans les cellules LHS-/- . Bien que la moyenne du niveau de glycérol libéré en présence du TNF- α soit également réduit dans les cellules LHS-/- ($0,10 \pm 0,02$ μ moles/ μ g ADN vs $0,16 \pm 0,04$ μ moles/ μ g ADN), ces réponses ne diffèrent pas de façon statistiquement significative.

3.1.5 Sécrétion de l'adiponectine dans les cellules fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS -/- différenciées

L'adiponectine sécrétée par les cellules LHS+/+ et LHS-/- différenciées a été dosée selon chacune des conditions : basale, β_3 -adrénergique et stimulée au TNF- α . La figure 24 montre des résultats préliminaires obtenus après une période d'incubation de 5 heures. Les données ne montrent pas de différence dans les niveaux d'adiponectine entre les génotypes normal (LHS+/+) et déficient en LHS (LHS-/-). De plus, dans ces conditions d'incubation, il n'y a pas de différence observée quant à la réponse aux différents stimuli ce qui suggère que les niveaux de sécrétion de l'adiponectine sont indépendants de l'expression de la LHS.

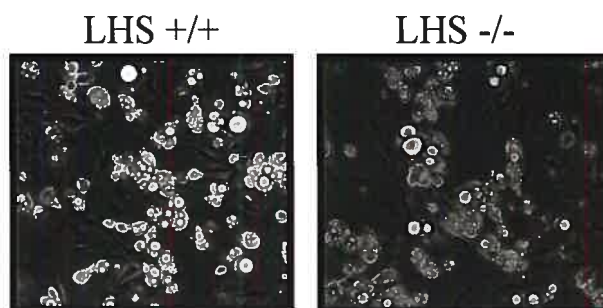


Figure 21 Différenciation des fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/. Microscopie à contraste de phase.

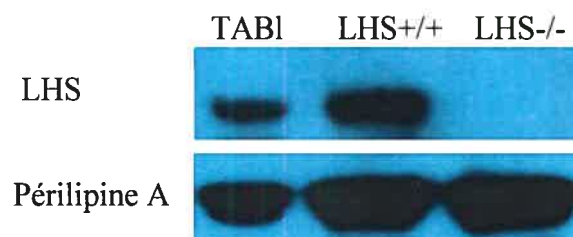


Figure 22 Expression de la LHS et de la pêrilipine dans les cellules fibroblastes embryonnaires après induction de leur différenciation. 40 μ g de protéines ont été utilisées à partir de lysat de cellules différenciées LHS+/+ et LHS-/- ainsi que du tissu adipeux blanc (TABI) de souris de génotype normale.

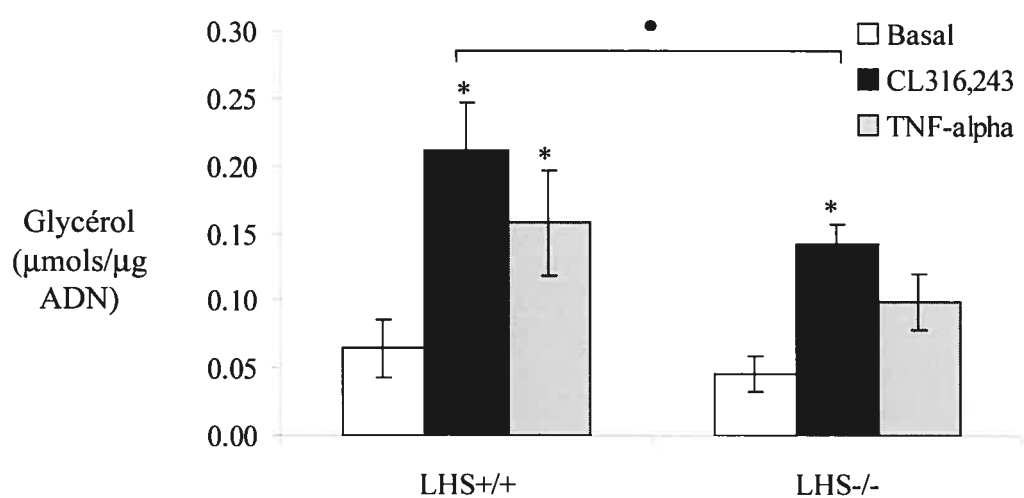


Figure 23 **Activité lipolytique dans les fibroblastes embryonnaires normaux (LHS+/+) et déficientes en lipase hormono-sensible (LHS-/-).** Essais après 24 heures d'incubation * $p < 0,05$ vs basal • $p < 0,05$ vs LHS+/+ (n=3).

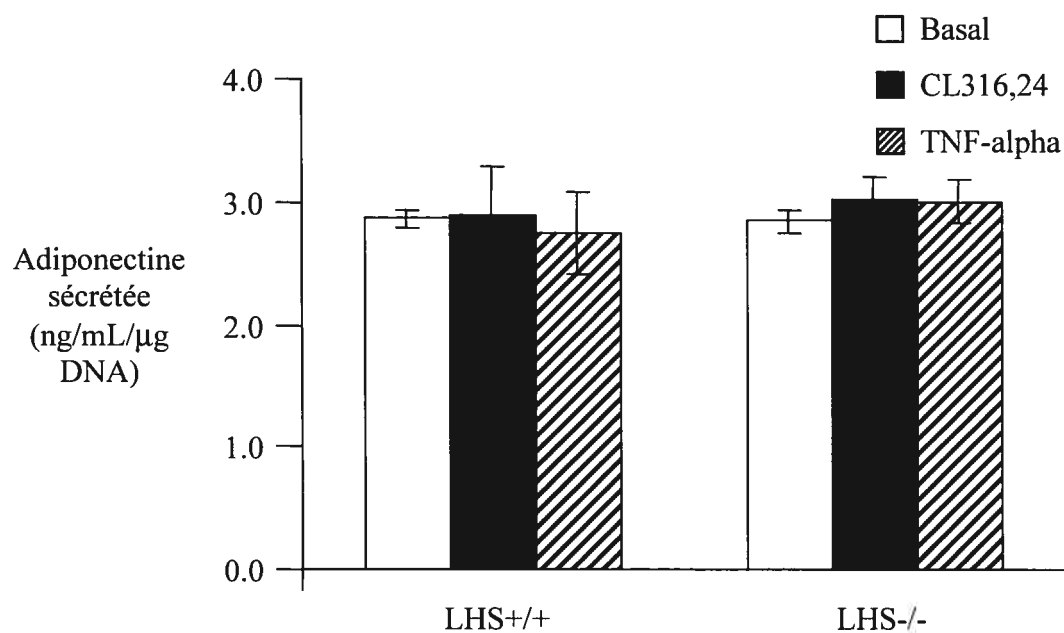


Figure 24 Niveaux d'adiponectine sécrétée par les fibroblastes embryonnaires normaux (LHS+/+) et déficients en lipase hormono-sensible (LHS-/-) différenciés. Les données ont été prises après 5 heures d'incubation (n=3).

3.3 ATTÉNUATION DE L'EXPRESSION DE TGH PAR INTERFÉRENCE À L'ARN

Les résultats obtenus dans les études effectuées sur les modèles de souris et d'adipocytes différenciés en culture suggèrent donc l'existence d'une lipase LHS-indépendante. Pour étudier l'effet potentiel de la lipase candidate, identifiée au laboratoire par Soni et al., la TGH, nous avons procédé à des expériences d'interférence à l'ARN. L'ATGL est également une lipase candidate dans la lipolyse LHS-indépendante. Des expériences d'interférence à l'ARN ciblant l'ATGL sont en cours et les résultats ne sont donc pas présentés dans ce mémoire.

3.1.6 Construction des clones et transfection

Les cellules ont été d'abord testées pour leur efficacité de transfection. Les techniques de lipofection (Lipofectamine, Fugene, Polyfect, DOTAP, PEI) n'ont permis que de très faibles pourcentages de transfection, soit moins que 5 %. L'électroporation, quant à elle, entraînait une mortalité trop élevée des cellules (plus que 50 %) en plus d'une efficacité de transfection nulle. Nous avons donc opté pour la méthode Amaxa à l'aide de la trousse de transfection Nucleofector[®]. Ceci nous a permis d'atteindre entre 40 et 50 % d'efficacité de transfection (figure 25).

Les cellules 3T3-F442A non différenciées ont été donc transfectées de façon stable avec les vecteurs pSilencer[™] 3.1-H1.hygro (contrôle négatif), pSilencer[™] 3.1-H1.hygro.siTGH1, pSilencer[™] 3.1-H1.hygro.siTGH2 et pSilencer[™] 3.1-H1.hygro.siTGH3 à l'aide de ce protocole. Cependant, les résultats présents correspondent aux données préliminaires obtenues sur les clones 3T3-F442A-siTGH2. Les expériences concernant les autres clones sont en cours.

3.1.7 Détection de l'expression de la TGH dans les cellules 3T3-F442A-siTGH2 différenciées

Le niveau de différenciation des clones stablement transfectés, 3T3-F442A.siTGH2, était similaire à celui des cellules 3T3-F442A de type normal (figure 26 A). La quantification de l'ARNm dans ces cellules a montré une baisse de 85 % des niveaux de transcrits TGH (figure 26 B). Par immunobuvardage à partir du lysat des cellules 3T3-F442A.siTGH2 différenciées, nous avons démontré une atténuation d'au moins 50 % de la protéine TGH (figure 26 C).

3.1.8 La lipolyse dans les cellules 3T3-F442A-siTGH2 différenciées

La lipolyse a été quantifiée dans les cellules 3T3-F442A.siTGH2 (figure 27). Les résultats obtenus montrent que l'activité lipolytique est abaissée dans chacune des conditions lipolytiques, basale, stimulée au CL316,243 et celle stimulée au TNF- α . Après 24 heures d'incubation, la quantité de glycérol libéré par les cellules 3T3-F442A.siTGH2 est diminuée de 27,9 % à l'état basal, de 44,0 % en réponse au CL316,243 et de 54,5 % en réponse au TNF- α .

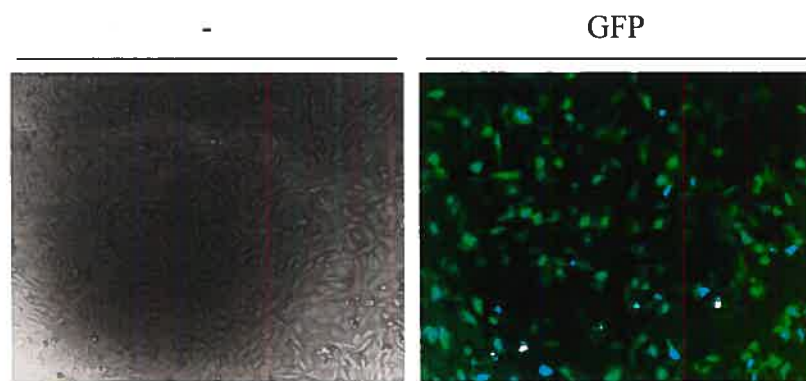
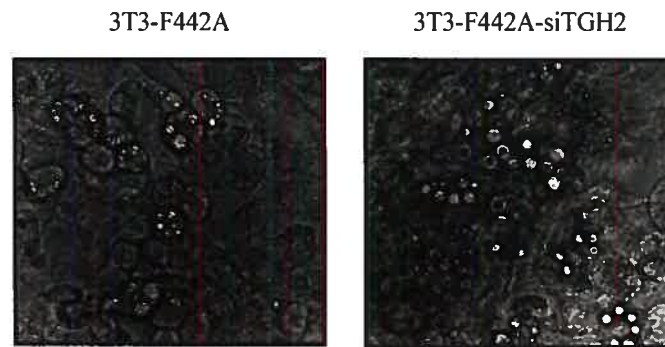
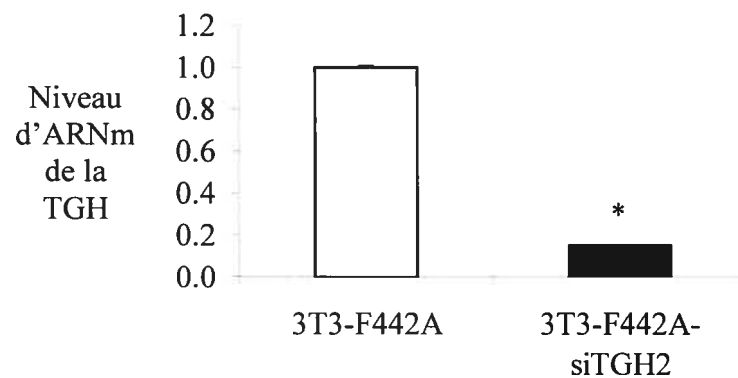


Figure 25 **Efficacité de transfection des préadipocytes NIH 3T3-F442A.** Les cellules non différenciées ont été transfectées avec un vecteur contenant un insert codant pour la protéine fluorescente verte, GFP.

A)



B)



C)

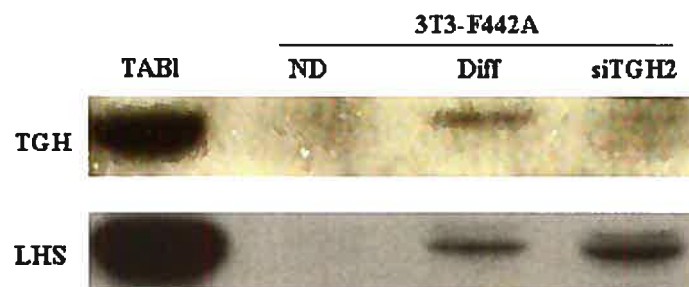


Figure 26 Atténuation du gène de la TGH par interférence à l'ARN dans les cellules 3T3-F442A. A) Microscopie B) Quantification de l'ARNm par PCR en temps réel ($p < 0,05$). C) Analyse immunobuvardage. TABl : tissu adipeux blanc de génotype normal; ND : non différenciées; Diff : différenciées; siTGH2 : transfectées.

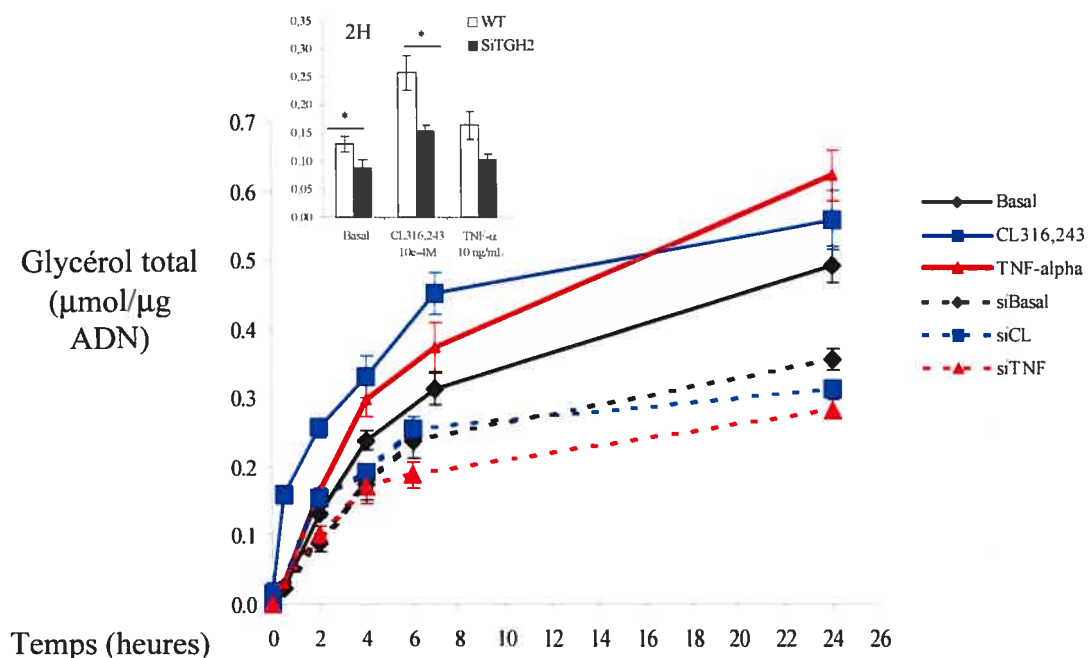


Figure 27 **Activité lipolytique dans les cellules 3T3-F442A différenciées normales et cellules transfectées avec le vecteur pSilencer™ 3.1.hygro.siTGH2. n=6; p<0,05.**

CHAPITRE 4 DISCUSSION

4.1 PRÉADIPOCYTES 3T3-F442A

4.1.1 *Différenciation des 3T3-F442A : considérations techniques :*

Mise au point du protocole de différenciation des cellules 3T3-F442A

La lignée cellulaire NIH 3T3-F442A est prédisposée à se différencier en adipocytes sous les conditions de culture appropriées (Green and Kehinde 1975). Nous avons choisi ce type de cellules pour sa capacité connue à se différencier en adipocytes plus aisément que les autres lignées cellulaires. Contrairement aux cellules préadipocytaires 3T3-L1, par exemple, les cellules 3T3-F442A ne nécessitent pas la présence du IBMX et du dexaméthasone pour se différencier.

En exposant les cellules à différentes conditions de culture, nous avons ajusté les paramètres de différenciation et standardisé le protocole. Avec le modèle des 3T3-F442A, nous obtenons un haut pourcentage de différenciation (80 à 90 %), constant et reproductible entre chaque essai (figure 12). De plus, ce pourcentage est atteint dans des délais reproductibles, soit 10 jours.

Caractérisation de la différenciation des cellules 3T3-F442A

Une fois induites, les cellules accumulent progressivement les lipides comme démontré par coloration à l'Huile Rouge (figure 12), un colorant utilisé pour marquer les lipides neutres (Ramirez-Zacarias, Castro-Munozledo et al. 1992). Les adipocytes différenciés en culture présentent un aspect multivésiculaire. Ceci ressemble plus aux préadipocytes qu'aux adipocytes matures de l'animal qui sont d'aspect

monovésiculaire. Par ailleurs, l'adipocyte différencié en culture porte beaucoup de similitudes par rapport aux adipocytes du TABI, tel que démontré par la détection de l'expression de l'ARNm et des protéines spécifiquement adipocytaires ainsi que par l'acquisition de la fonction lipolytique.

Il n'y avait pas de différence notée entre le rapport DG/TG dans le TABI et les cellules 3T3-F442A différenciées, soit 0,06 pour les cellules 3T3-F442A et $0,04 \pm 0,02$ pour le TABI. Cela dit, le dosage des lipides intracellulaires dans les cellules différenciées en culture a été effectué une seule fois et reste donc un résultat préliminaire. Toutefois, nous avons auparavant réalisé des essais d'optimisation pour évaluer le rendement de l'extraction des lipides. Cette technique nous a permis d'obtenir un pourcentage allant de 80 à 90 %.

Le ratio DG/TG permet d'évaluer le profil lipidique de l'adipocyte. Dans le TABI des souris LHS/-, le ratio DG/TG est augmenté (Fortier, Soni et al. 2005). Ceci s'explique par l'affinité de la LHS pour les DG (Fortier, Soni et al. 2005). Le changement du rapport DG/TG sera éventuellement étudié dans le modèle des cellules 3T3-F442A différenciées dans lesquelles sont préalablement atténuées les lipases LHS, TGH et ATGL.

Étude de la transcription dans les cellules 3T3-F442A différenciées

Dans la littérature, la quantification de l'ARNm par PCR en temps réel est habituellement exprimée en valeurs relatives du niveau de transcription du gène d'intérêt, normalisées avec celui d'un gène contrôle. Ce dernier doit être invariable entre les différents échantillons étudiés. Pour cela, trois messagers sont habituellement employés : l'ARN ribosomal (ARNr) 18S, la β -actine et la

glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Bustin 2000). L'utilisation de chacun de ces marqueurs comporte toutefois des inexactitudes dans le cas des cellules en différenciation.

La séquence de l'ARNr 18S est dépourvue de la queue polyA et son ADNc ne peut donc pas être synthétisé avec l'amorce dT (Argyropoulos, Psallida et al. 2006). La procédure de synthèse de l'ADNc de l'ARNr 18S doit donc être faite séparément. Ceci introduirait une marge d'erreur additionnelle aux mesures. Nous avons donc exclu l'utilisation de ces gènes comme témoins.

Nos résultats ont démontré que le niveau de transcription du gène de la β -actine est atténué dans les cellules différenciées (tableau V). Ceci concorde avec les données de la littérature qui suggèrent que les changements morphologiques des cellules lors de leur différenciation soient en étroite association avec la baisse de la synthèse des protéines du cytosquelette (Spiegelman and Farmer 1982). La β -actine ne peut donc pas être utilisée comme contrôle interne.

Inversement, nos résultats montrent que la transcription du gène de la GAPDH est induite lors de la différenciation des cellules (tableau V). La GAPDH est une enzyme de la glycolyse. Son niveau d'expression corrèle d'ailleurs avec l'obésité et concorde avec l'augmentation de l'activité glycolytique et la synthèse des acides gras (Renes, Bouwman et al. 2005). Comme beaucoup d'autres protéines du métabolisme lipidique, l'expression de la GAPDH est alors induite lors de la différenciation des adipocytes (Dugail, Quignard-Boulange et al. 1988) et ne peut donc pas être utilisée comme contrôle.

Aucun de ces marqueurs ne peut donc être employé comme contrôle interne puisqu'ils ne sont pas applicables au modèle de cellules en cours de différenciation. Ceci met en doute certaines conclusions rapportés dans la littérature (Hong, Huo et al. 2004; Yang, Hsu et al. 2004; Omatsu-Kanbe, Inoue et al. 2006). Nous avons donc

décidé de rapporter les résultats en valeurs absolues par μg d'ARN de départ utilisé pour la synthèse de l'ADNc. L'identification d'un transcrit stablement exprimé au cours de la différenciation serait d'une grande utilité pour les études futures.

Dans les cellules 3T3-F442A, nous avons confirmé l'expression de plusieurs gènes associés à l'adipocyte mature (tableau V). En effet, leur niveau de transcription est significativement induit lors de la différenciation. C'est le cas des gènes reliés à l'adipogenèse (DGAT1, PEPCK) tout comme de ceux de la fonction lipolytique (LHS, TGH, ATGL, périlipine). De plus, en collaboration avec Dr. K. Soni, nous avons démontré chez ces cellules l'expression de la périlipine et de la TGH par immunocytochimie (Soni, Lehner et al. 2004).

Dans la littérature, les cellules 3T3-F442A, tout comme les 3T3-L1, sont souvent laissées en différenciation pendant 8 jours, période après laquelle les essais sont faits (Hauger 1990). Dans notre système, les études ont été faites à 10 jours post-induction de la différenciation des cellules 3T3-F442A étant donné la consistance du degré de différenciation, la croissance et la viabilité au cours des études de lipolyse ainsi que de la reproductibilité des résultats. Au cours de la différenciation, les cellules 3T3-F442A acquièrent la capacité d'hydrolyser leurs réserves lipidiques, comme démontré par le dosage du glycérol libéré dans le milieu de culture. Ces cellules sont également capables de sécréter l'adipocytokine, leptine (figure 14 B). Dans notre système, nos résultats montrent également que les cellules 3T3-F442A atteignent un niveau de différenciation avancé à partir du 8^{ième} jour d'induction. Nous avons démontré ceci morphologiquement, par analyse microscopique et coloration à l'Huile Rouge (figure 12). Nous avons également démontré la mise en place de l'appareil lipolytique entre 8 et 10 jours par détection de l'expression des lipases LHS, TGH et ATGL ainsi que la périlipine par immunobuvardage (figure 13). Cependant, la quantité de glycérol libéré aux différents jours de différenciation des cellules 3T3-F442A ne plafonne pas (figure 14 A). Au contraire, au 16^{ième} jour post-induction, la relâche du glycérol reste en augmentation. Cependant, après environ 12 à 15 jours, nous avons détecté un

déclin dans la croissance des cellules. De plus, après une longue période de culture, quelques cellules peuvent entrer en sénescence. Les adipocytes sont de nature fragile par rapport à d'autres types cellulaires tels les fibroblastes et les cellules du muscle par exemple. En accumulant les lipides, les adipocytes prennent progressivement une forme sphérique et leur surface d'attache sur le pètri est alors réduite. Les adipocytes éclatent ou finissent tout simplement par se détacher lorsque les gouttelettes sont engorgées de lipides.

Lors des essais de lipolyse, les cellules sont lavées et le sérum est retiré du milieu pour approximativement 14 heures. Environ après deux semaines de différenciation, les cellules deviennent de moins en moins résistantes à ce stress et décollent de la surface du pètri.

Finalement, la fraction de différenciation est moins consistante après 8 jours qu'après 10 jours. C'est donc pour l'ensemble de ces raisons que nous avons décidé de procéder aux essais à 10 jours post-induction.

4.1.2 La lipolyse dans les adipocytes 3T3-F442A :

Mise au point de la lipolyse dans les cellules différenciées en culture

L'activité lipolytique est sensible aux variations des conditions de culture. Nous avons donc optimisé les dosages du glycérol et mis en place un protocole selon lequel les cellules répondent de manière stable et reproductible.

En retirant le sérum du milieu de culture environ 14 heures avant les essais, nous éliminons toute interférence pouvant être causée par les diverses composantes du SVF. En effet, ce dernier est riche en facteurs ayant un effet sur la lipolyse tels l'insuline. Les cellules sont plutôt exposées à 4 % d'albumine de sérum bovin (BSA). La BSA est souvent utilisée pour stabiliser les enzymes sans en affecter les fonctions. Sa présence dans le milieu de culture permet la stabilité de l'intégrité des cellules et a pour effet d'éliminer la mortalité cellulaire due au retrait du sérum.

Nous quantifions l'activité lipolytique par le dosage du glycérol libéré par les cellules dans le milieu. À cet effet, nous utilisons une méthode de luminométrie sensible, mise au point au laboratoire pour détecter des concentrations de glycérol aussi faibles que 0,001 mM. Pour cela, des aliquots de 20 μ L suffisent au dosage.

Pour étudier la lipolyse β_3 -adrénergique, nous utilisons 100 μ M de l'agoniste CL316,243 (figure 15). Nos résultats ont montré que les cellules différenciées ont une plus haute réponse aiguë à cette concentration. De plus, elle correspond à la concentration de CL316,243 utilisée au laboratoire sur les modèles de souris et des adipocytes isolés.

Tout comme rapporté dans la littérature, nous utilisons le TNF- α à une concentration de 10 ng/mL (Souza, Palmer et al. 2003). Nous avons toutefois testé l'effet de l'excès de cette cytokine sur le niveau de relâche du glycérol. Nous n'avons détecté aucune augmentation de la lipolyse basale après traitement des cellules différenciées avec 100 ng/mL de TNF- α durant 24 heures (figure 16). Ruan et al. ont rapporté que le traitement des adipocytes 3T3-L1 avec la cytokine TNF- α avait pour effet une suppression des gènes adipocytaires et une induction des marqueurs préadipocytaires (Ruan, Hacohen et al. 2002). Entre autres, le gène de la LHS est supprimé de 5,8 fois dans les cellules 3T3-L1 différenciées traitées 24 heures avec 1 nmoles/L de TNF- α (\sim 17,1 ng/mL) (Ruan, Hacohen et al. 2002). L'absence d'une réponse au TNF- α à

une concentration de 100 ng/mL pourrait donc être expliquée par la suppression de l'appareil lipolytique des cellules. Engelman et al. ainsi que d'autres ont rapporté la capacité du TNF- α à supprimer l'expression de gènes spécifiquement adipocytaires. De plus, les cellules traitées avec cette cytokine pendant 7 jours perdent leur phénotype adipocytaire et leur morphologie devient similaire à celles des fibroblastes (Engelman, Berg et al. 2000).

Profil lipolytique des cellules 3T3-F442A différenciées

Notre système de cellules différenciées en culture nous a permis de quantifier la lipolyse sur une période étalée sur 24 heures. Dans les cellules 3T3-F442A différenciées, ce profil lipolytique est reproductible. La lipolyse stimulée par le CL316,243 suit une cinétique différente de celle à l'état basal et celle activée par la cytokine TNF- α (figure 17).

La lipolyse basale

En absence de la cytokine TNF- α ainsi que du ligand β_3 -adrénergique (CL316,243), il y a un niveau basal de relâche du glycérol par les cellules différenciées. Nos résultats montrent qu'il constitue une fraction majeure par rapport à la lipolyse stimulée. Ceci met en évidence l'existence d'un mécanisme capable d'assurer de façon chronique une utilisation minimale des réserves lipidiques à l'intérieur de l'adipocyte. Bien que la quantité totale de glycérol sécrété dans le milieu augmente avec le temps, la vitesse de cette lipolyse basale est néanmoins diminuée. Ceci pourrait être le résultat d'une déplétion des réserves lipidiques à l'intérieur des

cellules différenciées. Une autre explication serait le déclin de l'état des cellules après une longue période d'incubation dans un milieu privé de sérum. Les observations microscopiques n'ont pas décelé une mortalité marquante des cellules ni un changement notable dans la taille des gouttelettes lipidiques. Il serait toutefois utile d'évaluer la viabilité des cellules par exemple en mesurant des marqueurs apoptotiques. Ceci permettrait de vérifier s'il s'agit d'une atténuation des mécanismes responsables de l'hydrolyse des lipides en réponse à une forte baisse des réserves lipidiques.

La lipolyse β_3 -adrénergique

Les différents essais lipolytiques dans les cellules 3T3-F442A différenciées ont montré que la réponse β_3 -adrénergique atteignait son plus haut niveau de stimulation durant les deux premières heures suivant l'induction au CL316,243. Les résultats montrent qu'après 30 minutes d'incubation, la vitesse de libération du glycérol est environ 10 fois plus élevée dans les cellules traitées avec le CL316,243 par rapport à la vitesse à l'état basal (figure 17 B). À partir d'environ 4 heures d'incubation, l'écart entre la réponse β_3 -adrénergique et la réponse basale est de plus en plus petit avec le temps. La réponse lipolytique face au stress β_3 -adrénergique est donc aiguë et plafonne par la suite.

Les récepteurs adrénergiques sont activés par les catécholamines pour inciter la cellule à répondre face à une réaction de stress. Les récepteurs β_3 -adrénergiques seraient impliqués dans la sensibilité des cellules adipeuses à fournir de manière rapide de l'énergie provenant de l'hydrolyse des lipides (Farias-Silva, Grassi-Kassisse et al. 1999). En exposant les cellules au CL316,243, les facteurs lipolytiques qui sont sous influence du récepteur β_3 -adrénergique seraient activés de manière

aiguë. À l'échelle de l'animal intact, ce phénomène est observé lorsque l'organisme fait face à une situation de stress où il est en besoin énergétique immédiat.

Pour mieux comprendre la lipolyse β_3 -adrénergique, il serait important de comprendre les mécanismes responsables de l'atténuation progressive de la réponse au CL316,243 qui a lieu tout au long de la période de 24 heures d'incubation. De nombreuses études ont rapporté que le récepteur β_3 -adrénergique était résistant à une désensibilisation puisqu'il est dépourvu de sites de phosphorylation dont la séquence consensus est requise pour la désensibilisation par les kinases à sérines (Barnes 1995; Giacobino 1995; Blaise, Grober et al. 1999; Wozniak, Schramm et al. 2000). Pourtant, Atgié et al. ont rapporté que les récepteurs β_3 -adrénergiques dans les cellules du tissu adipeux blanc épидидymal *in vivo* sont désensibilisés par une exposition chronique au CL316,243 (7 jours) (Atgié, Faintrenie et al. 1998). Il a été également rapporté dans une autre étude que le récepteur β_3 -adrénergique est sujet à une désensibilisation à long terme (Vicario, Candelore et al. 1998). Nos observations sont consistantes avec celle des autres études et suggèrent que la lipolyse β_3 -adrénergique peut être supprimée malgré le manque de ces sites de phosphorylation sur le récepteur β_3 -adrénergique.

La lipolyse stimulée au TNF- α

Les études portant sur l'obésité et la résistance à l'insuline portent beaucoup d'intérêt sur la régulation de la lipolyse par les phénomènes inflammatoires dans le tissu adipeux. La cytokine pro-inflammatoire, TNF- α , stimule la relâche du glycérol, mais diminue l'expression de la LHS (Raclot, Dauzats et al. 1998; Rosenstock, Greenberg et al. 2001). Le TNF- α agirait donc par une voie LHS-indépendante. Nos résultats montrent qu'en présence du TNF- α , la lipolyse suit la même cinétique que celle à l'état basal et que l'induction par cette cytokine est graduelle avec le temps. Bien

qu'elle ne soit pas statistiquement significative par rapport au niveau basal, cette constante augmentation est reproductible entre les essais. Dans une situation physiologique, ces élévations mineures deviennent substantielles avec le temps, ce qui pourrait se traduire en une accentuation du défaut métabolique chez l'organisme. De plus amples études seraient utiles et nécessaires pour la caractérisation de la lipolyse médiée par le TNF- α . Par exemple, il serait intéressant de tester l'effet de cette cytokine sur la lipolyse suite à une plus longue période d'incubation (36 heures, par exemple). L'écart serait alors possiblement significatif. L'utilisation d'inhibiteurs tels AICAR (inhibiteur de l'AMPK), le PD-98059 (inhibiteur de la voie ERK) et H-89 (inhibiteur de la PKA) permettraient de tracer les mécanismes moléculaires affectés par TNF- α en lien avec la lipolyse adipocytaire.

4.2 FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES LHS^{+/+} ET LHS^{-/-}

4.2.1 *Différenciation des fibroblastes embryonnaires LHS^{+/+} et LHS^{-/-} :*

Le modèle des fibroblastes embryonnaires différenciés en culture offre l'avantage d'étudier l'effet de la déficience de la lipase hormono-sensible en dehors des effets inter-organes. Plus précisément, ce système permet de vérifier les effets physiologiques observés chez les souris LHS^{-/-} et qui découlent de la déficience en LHS dans d'autres tissus. Lors de cette étude, nous avons optimisé les conditions de culture et mis en place un protocole de différenciation des cellules primaires de fibroblastes embryonnaires (figure 18).

Tout d'abord, par cette étude, nous avons démontré que la LHS n'est pas essentielle à la différenciation des cellules en adipocytes. L'ajout de l'agoniste PPAR γ , le rosiglitazone, au cocktail d'induction (IBMX, DEX et INS) a permis d'améliorer le

pourcentage de différenciation et de le rendre reproductible entre les essais. L'accumulation des lipides et la formation des gouttelettes lipidiques ont été démontrées par microscopie et coloration à l'Huile Rouge. Les observations n'ont pas montré de différence phénotypique entre les cellules différenciées LHS+/+ et LHS-/- (figure 20).

L'hétérogénéité des cellules du tissu adipeux provenant des souris déficientes en LHS n'a pas été observée en culture. Les cellules différenciées *in vivo* constituent un système homogène de par la stabilité des conditions de culture. Ceci contraste avec les différents événements externes pouvant influencer l'histologie du tissu adipeux des souris tels l'apport alimentaire, l'âge, la présence de tissu conjonctif et des différences hormonales locales et circulantes. Ainsi, une limite majeure de notre système d'étude est que les cellules fibroblastes embryonnaires différenciés en culture n'atteignent pas un stade aussi avancé qu'un adipocyte du tissu adipeux de l'animal. Ils sont également à un stade de différenciation plus précoce que les cellules 3T3-F442A différenciées. Cela dit, les gouttelettes ne sont pas assez engorgées de lipides pour éclater et déclencher des événements cellulaires *in vitro*.

Une hypothèse est que l'hétérogénéité observée dans le TABI des souris LHS-/- découle de tels événements. En effet, l'hypertrophie de certains adipocytes déclencherait une réponse cellulaire à ce stress physique suivie par une nécrose et un détachement de l'adipocyte, la libération de son contenu et l'invasion par les macrophages (Cinti, Mitchell et al. 2005). Nos études démontrent que les premières étapes de différenciation sont semblables entre les cellules LHS-/- et les cellules contrôles LHS+/+. Notre modèle ne permet pas l'étude des différences entre les adipocytes matures ni l'influence des cellules inflammatoires sur ce processus.

4.2.2 La lipolyse dans les fibroblastes embryonnaires LHS^{+/+} et LHS^{-/-} différenciés :

Nos études démontrent que l'absence de la LHS ne bloque pas l'activité lipolytique puisque la libération du glycérol est détectable dans ces cellules (figure 21). Ces observations concordent avec les résultats obtenus chez la souris et l'adipocyte isolé et confirment l'existence d'au moins un mécanisme alternatif compensant pour l'absence de la LHS (Fortier, Wang et al. 2004). Il s'agit donc d'un mécanisme pouvant être régulé de façon intrinsèque par l'adipocyte et indépendamment des effets inter-organes. Cependant, dans les cellules embryonnaires différenciées, le niveau moyen de la lipolyse basale en absence de la LHS est inférieur à celui en présence de la LHS. Ces deux valeurs ne sont toutefois pas statistiquement différentes. Cette observation diffère de ce qui a été obtenu pour l'adipocyte isolé des souris LHS^{-/-} où la lipolyse basale en absence de la LHS est supérieure à celle des adipocytes LHS^{+/+} (Fortier, Wang et al. 2004). Cette divergence dans les résultats peut justement être due à l'absence des interférences physiologiques externes. Cependant, les résultats obtenus avec la culture primaire de fibroblastes embryonnaires portent sur une seule lignée de chaque génotype. Le pourcentage de différenciation ainsi que la capacité de réponse lipolytique peut différer d'une lignée à une autre dépendamment de la prédisposition des lignées à se différencier en adipocytes. Afin de tirer des conclusions définitives, il serait nécessaire de tester différentes lignées d'embryons LHS^{+/+} et LHS^{-/-} et qui sont issus de différentes souris parentales.

Dans les cellules embryonnaires LHS^{-/-} différenciées, la réponse au CL316,243 est atténuée d'environ 30 %. Ceci concorde avec les résultats obtenus dans le modèle de l'adipocyte isolé et de l'animal intact. Cela dit, la détection d'une réponse β -adrénergique dans les cellules LHS^{-/-} différenciées, démontre qu'il existe un mécanisme par lequel l'AMPc induit la lipolyse autre que par l'activation de la LHS. Ceci suggère que les lipases candidates partagent un mécanisme d'activation de

l'hydrolyse des lipides. Une explication possible est que le détachement de la périlipine de la gouttelette lipidique une fois phosphorylée en réponse au CL316,243 permet l'accès des autres lipases candidates aux TG de la gouttelette lipidique (figure 9).

Peu de données sont connues sur les mécanismes d'activation de la lipolyse par la cytokine TNF- α . Selon les résultats obtenus, le moyen de la lipolyse stimulée au TNF- α est plus bas dans les cellules LHS-/- que dans les cellules LHS+/+. Le TNF- α jouerait donc un rôle dans la lipolyse dépendante de la LHS comme dans la lipolyse médiée par les lipases non-LHS. Cependant, cette atténuation n'est pas significative et d'autres essais avec de nouvelles lignées permettraient de mieux conclure quant à l'effet de cette cytokine sur la lipolyse.

4.2.3 Sécrétion de l'adiponectine par les fibroblastes embryonnaires LHS+/+ et LHS-/- différenciés :

Le dosage de l'adiponectine dans les cellules primaires différenciées est préliminaire. Il ne semble pas y avoir de différence dans la sécrétion de l'adiponectine en présence ou en absence de la LHS dans les conditions de mesure présentées à la figure 22. Chez les souris déficientes en LHS, les niveaux circulants d'adiponectine sont abaissés (Harada, Shen et al. 2003). Peu de données sont connues à propos de la régulation de l'adiponectine en lien avec l'activité lipolytique. Dans le TABI des souris LHS-/-, la baisse des niveaux de sécrétion de l'adiponectine serait causée par une inhibition due à la grosseur de la taille des adipocytes. Nos résultats vont contre un défaut primaire de la sécrétion de l'adiponectine dans les cellules LHS-/. D'autres conditions de mesure doivent donc être testées pour pouvoir en conclure, telle la durée d'incubation des stimulants. Ceci permettrait de vérifier si l'effet de la diminution de l'adiponectine

chez les souris LHS-/- est dû à la déficience en LHS ou à une régulation indépendante des adipocytes.

4.3 ATTÉNUATION DE L'EXPRESSION DE LA TGH DANS LES CELLULES 3T3-F442A PAR INTERFÉRENCE À L'ARN

Nous avons utilisé l'interférence à l'ARN puisque cette technique permet de déceler l'effet de l'atténuation de l'expression de la TGH plus rapidement que l'approche génétique qui consiste en la génération de lignées de souris génétiquement altérées.

L'hypothèse de départ était que la suppression de la TGH dans les cellules différenciées atténuerait, et ce, de façon drastique, la lipolyse basale. La lipolyse β_3 -adrénergique aurait été moins affectée (tableau VIII). Cette hypothèse découle de l'idée que la lipase TGH soit responsable de la lipolyse basale étant donné sa présence à la surface de la gouttelette lipidique (figure 8 et 9).

Les résultats obtenus montrent une suppression de l'ensemble de l'activité lipolytique où la libération du glycérol est diminuée dans chacune des conditions : basale, stimulée au CL316,243 et stimulée au TNF- α . En médiant la lipolyse basale, la TGH serait limitante à toute stimulation venant répondre à une croissance du besoin énergétique. Ainsi, toutes les autres formes de lipolyse seraient dépendantes de l'activité basale de l'appareil lipolytique et donc de TGH (tableau VIII).

L'atténuation de l'expression de la TGH dans les cellules 3T3-F442A a résulté en la baisse de l'activité lipolytique. Ceci suggère l'implication de la TGH dans l'hydrolyse des TG. La lipolyse basale reste toutefois une fraction majeure de la

lipolyse adipocytaire. La réponse lipolytique est donc fonction du niveau d'atténuation de la lipase. Avant de tirer des conclusions définitives, il serait nécessaire d'étudier plus d'une lignée de cellules dont le niveau de TGH est supprimé par interférence à L'ARN. Pour cela, des essais avec les deux autres lignées clonales sont en cours (siTGH1 et siTGH3).

De plus, les mesures propres au clone 3T3-F442A.hygro (contrôle négatif) permettra de déterminer si la baisse de la lipolyse est due à un facteur indépendant de la TGH (ex : transfection et exposition des cellules à l'antibiotique). Parallèlement, des études ont été entamées au laboratoire sur un modèle de souris déficientes en TGH (TGH^{-/-}).

4.4 PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce projet, nous avons apporté un nouvel outil d'étude au laboratoire, soit les cellules différenciées en culture. Les études sur ce modèle permettront l'étude spécifique des interactions intra-adipocytaires et viendront compléter les données recueillies dans les adipocytes isolés et l'animal intact pour pouvoir éventuellement être rapportées sur l'échelle de l'humain. À l'aide des cellules en culture, nous avons mis en place un protocole de différenciation adipocytaire, caractérisé sur une vue générale le profil lipolytique dans ces cellules et identifié trois formes de lipolyses : basale, β_3 -adrénergique et stimulée par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α . Avec les techniques ainsi développées et présentées, nous entamons maintenant des études plus approfondies sur ce modèle dans le but de tracer et de caractériser les voies qui composent la lipolyse adipocytaire. Nous avons entre autres procédé à la construction de clones siATGL pour étudier l'effet de cette lipase sur la lipolyse. Ceci permettra d'explorer le lien de l'ATGL par rapport aux autres lipases et ainsi pouvoir définir les composantes de l'appareil lipolytique et leur fonction dans les mécanismes

lipolytiques. Ces études permettront de déterminer l'importance des différentes lipases individuellement et collectivement dans la lipolyse et pourraient ainsi contribuer à une vision plus précise des composantes adipeuses affectées par le syndrome métabolique ainsi que de la physiologie adipocytaire.

	Déficience étudiée	Lipolyse basale	Lipolyse stimulée	
			CL316,243	TNF- α
Hypothèse initiale	HSL	-	↓↓↓	?
	TGH	↓↓↓	↓	↓↓
Résultats	HSL	-	↓↓	↓ ?
	TGH	↓	↓	↓

Tableau VII

Hypothèses et conclusions quant à l'effet de la déficience des lipases étudiées sur chacune des formes de lipolyse : basale et stimulée.

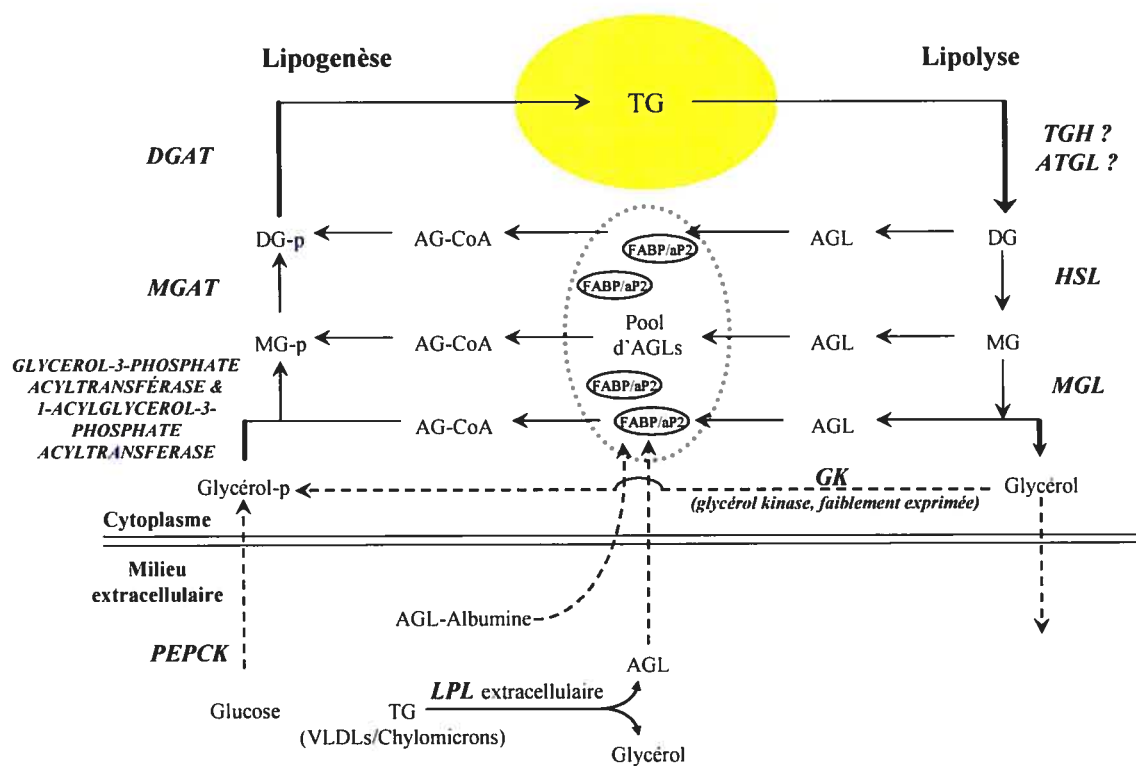


Figure 28 Hypothèse actuelle quant à la lipolyse et la lipogenèse dans le tissu adipeux.

SOURCES DOCUMENTAIRES

- Adams, M., Reginato, M. J., Shao, D., Lazar, M. A., et Chatterjee, V. K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272, 5128-5132.
- Ahima, R. S., et Flier, J. S. (2000). Leptin. *Annu Rev Physiol* 62, 413-437.
- Alam, M., Ho, S., Vance, D. E., et Lehner, R. (2002a). Heterologous expression, purification and characterization of human triacylglycerol hydrolase. *Protein Expression Purif* 24, 33-42.
- Alam, M., Vance, D. E., et Lehner, R. (2002b). Structure-function analysis of human triacylglycerol hydrolase by site-directed mutagenesis : identification of the catalytic triad and a glycosylation site. *Biochemistry* 41, 6679-6687.
- Albright, A. L., et Stem, J. S. (2006). Adipose Tissue. *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*.
- Alexander, D. L., Ganem, L. G., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F., et Jefcoate, C. R. (1998). Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *Journal of Cell Science* 111, 3311-3322.
- Anthonsen, M. W., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E., et Holm, C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem* 273, 215-221.
- Antras-Ferry, J., Robin, P., Robin, D., et Forest, C. (1995). Fatty acids and fibrates are potent inducers of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in adipocytes. *Eur J Biochem* 234, 390-396.

- Argyropoulos, D., Psallida, C., et Spyropoulos, C. G. (2006). Generic normalization method for real-time PCR. *The FEBS Journal* 273, 770-777.
- Argyropoulos, D., Psallida, C., et Spyropoulos, C. G. (2006). Generic normalization method for real-time PCR. *The FEBS Journal* 273, 770-777.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, K., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 2619-2623.
- Arthenstaedt, K., et Daum, G. (2003). YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 23317-23323.
- Atgié, C., Faintrenie, G., Carpéné, C., Bukowiecki, L. J., et Géloën, A. (1998). Effects of Chronic Treatment with Noradrenaline or a Specific beta3-Adrenergic Agonist, CL316 243, on Energy Expenditure and Epididymal Adipocyte Lipolytic Activity in Rat. *Comp Biochem Physiol* 119A, 629-636.
- Atgié, C., Faintrenie, G., Carpéné, C., Bukowiecki, L. J., et Géloën, A. (1998). Effects of Chronic Treatment with Noradrenaline or a Specific beta3-Adrenergic Agonist, CL316 243, on Energy Expenditure and Epididymal Adipocyte Lipolytic Activity in Rat. *Comp Biochem Physiol* 119A, 629-636.
- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A., et Evans, R. M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4, 585-595.
- Barnes, P. J. (1995). Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Resp Crit Care Med* 152, 838-860.

- Bastie, C., Holst, D., Gaillard, D., Jehl-Pietri, C., et Grimaldi, P. A. (1999). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3-C2 fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 21920-21925.
- Baudin, G. (2000). La leptine. Description, rôle physiologique : Utilité diagnostique et thérapeutique. *Revue de l'ACOMEN* 6, 28-32.
- Becker, A., Bottcher, A., Lackner, K. J., Fehringer, P., Notka, F., Aslanidis, C., et Schmitz, G. (1994). Purification, cloning and expression of a human enzyme with acyl coenzyme A : cholesterol acyltransferase activity, which is identical to liver carboxylesterase. *Arterioscler Thromb* 14, 1346-1355.
- Bjorbaek, C., El-Hashimi, K., Frantz, J. D., et Flier, J. S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274, 30059-30065.
- Blaak, E. E. (2003). Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc* 62, 753-760.
- Blaise, R., Grober, J., Rouet, P., Tavernier, G., Daegelen, D., et Langin, D. (1999). Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins. *J Biol Chem* 274, 9327-9334.
- Blaise, R., Grober, J., Rouet, P., Tavernier, G., Daegelen, D., et Langin, D. (1999). Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins. *J Biol Chem* 274, 9327-9334.
- Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Barber, T., Coxey, R. A., Takeda, T., Rondinone, C. M., Theodorakis, J. L., Greenberg, A. S., et Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *Journal of Lipid Research* 36, 1211-1226.

- Botin, L. M., et Green, A. (1999). Long-term regulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase by insulin and glucose. *Diabetes* 48, 1691-1697.
- Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J., et Londos, C. (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of Lipid Research* 38, 2249-2263.
- Brown, M. S., et Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway : regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Brun, R. P., Kim, J. B., Hu, E., Altiock, S., et Spiegelman, B. M. (1996a). Adipocyte differentiation : a transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol* 8, 826-832.
- Brun, R. P., Tontonoz, P., Forman, B. M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R. M., et Spiegelman, B. M. (1996b). Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10, 974-984.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.
- Camp, H. S., et Tafuri, S. R. (1997). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 10811-10816.
- Carey, G. (1998). *Mechanisms regulating adipocyte lipolysis*, Plenum Press edn (New York).
- Carmen, G.-Y., et Victor, S.-M. (2005). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling* [*Epub ahead of print*].

- Cinti, S., Mitchell, G. A., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., et Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophages localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-2355.
- Clifford, G. M., Londos, C., Kraemer, F. B., Vernon, R. G., et Yeaman, S. J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perillipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275, 5011-5015.
- Contreras, J. A. (2002). Hormone-sensitive lipase is not required for cholesteryl ester hydrolysis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 900-903.
- Cook, K. G., Yeaman, S. J., Stralfors, P., Fredrickson, G., et Belfrage, P. (1982). Direct evidence that cholesterol ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur J Biochem* 125, 245-249.
- Dani, C., Smith, A. G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., et Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110, 1279-1285.
- Darlington, G. J., Ross, S. E., et MacDougald, O. A. (1998). The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273, 300057-300060.
- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J. D., Seehra, J., et Somers, W. S. (1999). Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97, 349-360.
- Desvergne, B., et Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors : nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-688.

- Diczfalussy, M. A., Bjorkhem, I., Einarsson, K., et Alexson, S. E. (1996). Acyl-coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase is not identical to liver microsomal carboxylesterase. *Arterioscler Thromb Vasc biol* 16, 606-610.
- Dobiasova, M. (1963). A Simple Method for the Separation of Minute Amounts of Tissue Lipids by Thin-Layer Chromatography and Gas-Liquid Chromatography. *J Lipid Res* 4, 481-482.
- Dolinsky, V. W., Douglas, D. N., Lehner, R., et Vance, D. E. (2004a). Dexamethasone down-regulates the expression of triacylglycerol hydrolase and triacylglycerol lipolysis in the livers of mice. *Biochem J* 378, 967-974.
- Dolinsky, V. W., Gilham, D., Alam, M., Vance, D. E., et Lehner, R. (2004b). Triacylglycerol hydrolase : role in intracellular lipid metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 1633-1651.
- Dolinsky, V. W., Gilham, D., Hatch, G. M., Agellon, L. B., Lehner, R., et Vance, D. E. (2003). Regulation of triacylglycerol hydrolase expression by dietary fatty acids and peroxisomal proliferator-activated receptors. *Biochemica and Biophysica Acta* 1635, 20-28.
- Dolinsky, V. W., Sipione, S., Lehner, R., et Vance, D. E. (2001). The cloning and expression of a murine triacylglycerol hydrolase cDNA and the structure of its corresponding gene. *Biochim Biophys Acta* 1532, 162-172.
- Dugail, I., Quignard-Boulange, A., Bazin, R., Le Liepvre, X., et Lavau, M. (1988). Adipose-tissue-specific increase in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and mRNA amounts in suckling pre-obese Zucker rats. *Biochem J* 354, 483-487.
- Dugail, I., Quignard-Boulange, A., Bazin, R., Le Liepvre, X., et Lavau, M. (1988). Adipose-tissue-specific increase in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and mRNA amounts in suckling pre-obese Zucker rats. *Biochem J* 354, 483-487.

- Engvall, E., et Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Escary, J. L., Choy, H. A., Reue, K., et Schotz, M. C. (1998). Hormone-sensitive lipase overexpression increases cholesteryl ester hydrolysis in macrophages foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc biol* 18, 991-998.
- Escary, J. L., Choy, H. A., Reue, K., Wang, X. P., Castellani, L. W., Glass, C. K., Lusis, A. J., et Schotz, M. C. (1999). Paradoxical effect on atherosclerosis of hormone-sensitive lipase overexpression in macrophages. *The journal of Lipid Research* 40, 397-404.
- Fajas, L., Fruchart, J.-C., et Auwerx, J. (1998). Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 10, 165-173.
- Farias-Silva, E., Grassi-Kassisse, D. M., Wolf-Nunes, V., et Spadari-Bratfisch, R. C. (1999). Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *Journal of Lipid Research* 40, 1719-1727.
- Farias-Silva, E., Grassi-Kassisse, D. M., Wolf-Nunes, V., et Spadari-Bratfisch, R. C. (1999). Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *Journal of Lipid Research* 40, 1719-1727.
- Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., *et al.* (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110, 1093-1103.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., et Evans, R. M. (1995). 15-deoxy-D12,14 prostaglandinGJ2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPARgamma. *Cell* 83.

- Fortier, M., Soni, K., Laurin, N., Wang, S., Mauriege, P., Jirik, F. R., et Mitchell, G. A. (2005). Human hormone-sensitive lipase (HSL): expression in white fat corrects the white adipose phenotype of HSL-deficient mice. *Journal of Lipid Research* 46, 1860-1867.
- Fortier, M., Wang, S. P., Mauriege, P., Semache, M., Mfuma, L., Li, H., Levy, E., Richard, D., et Mitchell, G. A. (2004). Hormone-sensitive lipase-independent adipocyte lipolysis during beta-adrenergic stimulation, fasting, and dietary fat loading. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E282-288.
- Frayn, K. N., Coppack, S. W., Fielding, B. A., et Humphreys, S. M. (1995). Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo : implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme Regul* 35, 163-178.
- Fredrikson, G., et Belfrage, P. (1983). Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *J Biol Chem* 258, 14253-14256.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A. et Greenberg, A. S. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6 : Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(3), 3 847-850.
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., *et al.* (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307, 426-430.
- Gharbi-Chichi, J., Grimaldi, P., Torresani, J., et Ailhaud, G. (1981). Triiodothyronine and adipose conversion of OB17 preadipocytes : binding to high affinity sites and effects on fatty acid synthesizing and esterifying enzymes. *J Recept Res* 2, 153-173.

- Ghosh, S. (2000). Cholesteryl ester hydrolase in human monocyte/macrophage : cloning, sequencing and expression of full-length cDNA. *Physiol Genomics* 2, 1-8.
- Ghosh, S., St Clair, R. W., et Rudel, L. L. (2003). Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase. *J Lipid Res* 44, 1833-1840.
- Giacobino, J. P. (1995). Beta3-Adrenoceptor : an update. *Eur J Endocrinol* 132, 377-385.
- Gilham, D., Alam, M., Gao, W., Vance, D. E., et Lehner, R. (2005). Triacylglycerol Hydrolase Is Localized to the Endoplasmic Reticulum by an Unusual Retrieval Sequence where It Participates in VLDL Assembly without Utilizing VLDL Lipids as Substrates. *Molecular Biology of the Cell* 16, 984-996.
- Gilham, D., Ho, S., Rasouli, M., Martres, P., Vance, D. E., et Lehner, R. (2003). Inhibitors of hepatic microsomal triacylglycerol hydrolase decrease very low density lipoprotein secretion. *FASEB J* 17, 1685-1687.
- Glenny, H. P., et Brindley, D. N. (1978). The effects of cortisol, corticotropin and thyroxine on the synthesis of glycerolipids and on the phosphatidate phosphohydrolase activity in rat liver. *Biochem J* 176, 777-784.
- Graham, T. E., Yang, Q., Bluher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wason, C. J., Oberbach, A., Jansson, P.-A., Smith, U., et Kahn, B. B. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean and obese subjects and subjects with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 254.
- Green, A., Dobias, S. B., Walters, D. J., et Brasier, A. R. (1994). Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. *Endocrinology* 134, 2581-2588.

- Green, H., et Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19-27.
- Green, H., et Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19-27.
- Greenberg, A. S., Shen, W. J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A., et Kraemer, F. B. (2001). Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 45456-45461.
- Gregoire, F. M. (2001). Adipocyte Differentiation : From Fibroblast to Endocrine Cell. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 997-1002.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., et Sul, H. S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* 78, 783-801.
- Grober, J., Laurell, H., Blaise, R., Fabry, B., Schaak, S., Holm, C., et Langin, D. (1997). Characterization of the promoter of human adipocyte hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 328 (Pt 2), 453-461.
- Harada, K., Shen, W. J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J. I., Ishibashi, S., et Kraemer, F. B. (2003). Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1182-E1195.
- Harvey, M., Sands, A. T., Weiss, R. S., Hegi, M. E., Wiseman, R. W., Pantazis, P., Giovanella, B. C., Tainsky, M. A., Bradley, A., et Donehower, L. A. (1993). In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 2457-2467.

- Hauner, H. (1990). Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium : comparison to serum-containing culture conditions. *Endocrinology* 127, 865-872.
- Henry, R. R. (1997). Thiazolidinediones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26, 553-573.
- Himms-Hagen, J. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis : interdisciplinary studies. *FASEB J*, 2890-2898.
- Hoffstedt, J., Arvidsson, E., Sjölin, E., Wahlén, K., et Arner, P. (2004). Adipose Tissue Adiponectin Production and Adiponectin Serum Concentration in Human Obesity and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 1391-1396.
- Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions* 31, 1120-1124.
- Holm, C., Kirchgessner, T. G., Svenson, K. L., Fredrickson, G., Nilsson, N. O., Miller, C. G., Shively, J. E., Heinzmann, C., Sparkes, R. S., Mohandas, T., et al., (1988). Hormone-sensitive lipase : sequence, expression and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* 241, 1503-1506.
- Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H., et Contreras, J. A. (2000). Molecular Mechanisms Regulating Hormone-Sensitive Lipase and Lipolysis. *Annu Rev Nutr* 20, 356-393.
- Hong, S., Huo, H., Xu, J., et Liao, K. (2004). Insulin-like growth factor-1 receptor signaling in 3T3-L1 adipocyte differentiation requires lipid rafts but not caveolae. *Cell Death and Differentiation* 11, 714-723.
- Hotamisligil, G. S., et Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43, 1271-1278.

- Hummerickhouse, R., Lohrbach, K., Li, L., Bosron, W. F., et Dolan, M. E. (2000). Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res* 60, 1189-1192.
- Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B., et Gross, R. W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279, 48968-48975.
- Jenkins-Kruchten, A. E., Bennaars-Eiden, A., Ross, J. R., Shen, W.-J., Kraemer, F. B., et Bernlohr, D. A. (2003). Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction : Fatty acid dependence on binding. 278, 47636-14256.
- Jepson, C. A., Harrison, J. A., Kraemer, F. B., et Yeaman, S. J. (1996). Down-regulation of hormone-sensitive lipase in sterol ester-laden J774.2 macrophages. *Biochem J* 318, 173-177.
- Jiang, M. S., Tang, Q. Q., Mc Lenithan, J., Geiman, D., Shillinglaw, W., Henzel, W. J., et Lane, D. (1998). Derepression of the C/EBPalpha gene during adipogenesis : identification of AP-2alpha as a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95.
- Kather, H., Schroder, F., et Simon, B. (1982). Microdetermination of glycerol using bacterial NADH-linked luciferase. *Clinica Acta* 120, 295-300.
- Kershaw, E. E., et Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.
- Kim, J. Y., Tillison, K., Lee, J.-H., Rearick, D. A., et Smas, C. M. (2006). The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E115-E127.

- Knutson, V. P. (1992). Ligand-independent internalization and recycling of the insulin receptor. Effects of chronic treatment of 3T3-C2 fibroblasts with insulin and dexamethasone. *J Biol Chem* 267, 931-937.
- Konieczny, S. F., et Emerson, C. P. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells : evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* 38, 791-800.
- Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., et Fasshauer, M. (2005). Isoproterenol, TNF α , and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 240, 43-49.
- Langfort, J., Ploug, T., Ihlemann, J., Enevoldsen, L. H., Stallknecht, B., Saldo, M., Kjaer, M., Holm, C., et Galbo, H. (1998). Hormone-sensitive lipase (HSL) expression and regulation in skeletal muscle. *Adv Exp Med Biol* 441.
- Langin, D., Laurell, H., Holst, D., Belfrage, P., et Holm, C. (1993). Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase : possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4897-4901.
- Lau, D. C. W., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P. E., et Verma, S. (2005). Adipokines : Molecular links between Obesity and Atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2031-H2041.
- Lee, W., Ryu, J., Hah, J., Tsujita, T., et Jung, C. Y. (2000). Association of carboxyl esterase with facilitative glucose transporter isoform 4 (GLUT4) intracellular compartments.
- Lehner, R., et Vance, D. E. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding a hepatic microsomal lipase that mobilizes stores triacylglycerol. *Biochem J* 341, 1-10.

- Lehner, R., et Verger, R. (1997). Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase. *Biochemistry* 36, 1861-1868.
- Lehner, R., Cui, Z., et Vance, D. E. (1999). Subcellular localization, development expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J* 338, 761-768.
- Leung, D., Hardouin, C., Boger, D. L., et Cravatt, B. F. (2003). Discovering potent and selective reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes. *Nat Biotech* 21, 687-691.
- Li, H., Brochu, M., Wang, S. P., Rochdi, L., Côté, M., Mitchell, G. A., et Gallo-Payet, N. (2002). Hormone-Sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Lipid Storage in The Adrenal Cortex and Impaired Corticosterone Response to Corticotropin Stimulation. *Endocrinology* 143, 3333-3340.
- Li, Z., Sumida, M., Birchbauer, A., Schotz, M. C., et Reue, K. (1994). Isolation and characterization of the gene for mouse hormone-sensitive lipase. *Genomics* 24, 259-265.
- Liu, X. (2003). Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J Clin Invest* 111, 399-407.
- Londos, C., Brasaemle, D. L., Schultz, C. J., Segrest, J. P., et Kimmel, A. R. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Cell and Developmental Biology* 10, 51-58.
- Matsumshima, M., Inoue, M., Tsukada, S., Miki, K., Kurokawa, K., Takahashi, T., et Takahashi, K. (1991). The nucleotide and deduced amino acid sequences of porcine liver proline-beta-naphthylamidase. Evidence for the identity with carboxylase. *FEBS Lett* 293, 37-41.

- Mikhailov, A. T., et Torrado, M. (2000). Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract : a functional shift pivotal for male fertility. *Fron Biosci* 5, 53-62.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., *et al.* (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908.
- Morgan, E. W., Yan, B., Greenway, D., et Parkinson, A. (1994). Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterase isozymes : species differences, tissue distribution and the effects of age, sex, and xenobiotic treatment of rats. *Arch Biochem Biophys* 315, 513-526.
- Murphy, D. J., et Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-droplet formation. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 109-115.
- Ntambi, J. M., et Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130, 3122S-3126S.
- Omatsu-Kanbe, M., Inoue, K., Fujii, Y., Yamamoto, T., Isono, T., Fujita, N., et Matsuura, H. (2006). Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J* 393, 171-180.
- Osterlund, T. (2001). Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem* 268, 1899-1907.
- Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F. B., Tsutsumi, O., et Yamada, N. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *PNAS* 97, 787-792.

- Park, S. Y., Kim, H. J., Wang, S., Higashimori, T., Dong, J., Kim, Y. J., Cline, G., Li, H., Prentki, M., Shulman, G. I., *et al.* (2005). Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E30-39.
- Picard, F., et Auwerx, J. (2002). PPARgamma and Glucose Homeostasis. *Annu Rev Nutr* 22, 167-197.
- Pittas, A. G., Joseph, N. A., et Greenberg, A. S. (2004). Adipocytokines and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 447-452.
- Pl  c-Gautier, E., Grober, J., Duplus, E., Langin, D., et Forest, C. (1996). Inhibition of hormone-sensitive lipase gene expression by cAMP and phorbol esters in 3T3-F442A and BFC-1 adipocytes. *Biochem J* 318, 1057-1063.
- Polonsky, K. S. (2006). Retinol-binding protein 4, insulin resistance and type 2 diabetes. *N Engl J Med* 354, 2596-2598.
- Raben, D. M., et Baldassare, J. J. (2005). A new lipase in regulating lipid mobilization : hormone-sensitive lipase is not alone. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 16.
- Raclot, T., Dauzats, M., et Langin, D. (1998). Regulation of hormone-sensitive lipase expression by glucose in 3T3-F442A adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 510-513.
- Raclot, T., Dauzats, M., et Langin, D. (1998). Regulation of hormone-sensitive lipase expression by glucose in 3T3-F442A adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 510-513.

- Raclot, T., Dauzats, M., et Langin, D. (1998). Regulation of hormone-sensitive lipase expression by glucose in 3T3-F442A adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 510-513.
- Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F., et Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97, 493-497.
- Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F., et Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97, 493-497.
- Rangwala, S. M., et Lazar, M. A. (2000). Transcriptional Control of Adipogenesis. *Annu Rev Nutr* 20, 535-559.
- Renes, J., Bouwman, F., Noben, J.-P., Evelo, C., Robben, J., et Mariman, E. (2005). Protein profiling of 3T3-L1 adipocyte differentiation and (tumor necrosis factor alpha-mediated) starvation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 492-503.
- Renes, J., Bouwman, F., Noben, J.-P., Evelo, C., Robben, J., et Mariman, E. (2005). Protein profiling of 3T3-L1 adipocyte differentiation and (tumor necrosis factor alpha-mediated) starvation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 492-503.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., et Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *J Biol Chem* 278, 30413-30416.
- Ricquier, D., et Bouillaud, F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins : from mitochondria to the regulation of energy balance. *The Journal of Physiology* 529, 3-10.

- Ritchie, S. A., Ewart, M.-A., Perry, C. G., Connell, J. M. C., et Salt, I. P. (2004). The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. *Clinical Science* 107, 519-532.
- Robbi, M., et Beaufay, H. (1991). The COOH terminus of several liver carboxylesterases targets these enzymes to the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266.
- Roduit, R., Masiello, P., Wang, S. P., Li, H., Mitchell, G. A., et Prentki, M. (2001). A Role for Hormone-Sensitive Lipase in Glucose-Stimulated Insulin Secretion : A study in Hormone-Sensitive Lipase-Deficient Mice. *Diabetes* 50, 1970-1975.
- Rosenstock, M., Greenberg, A. S., et Rudich, A. (2001). Distinct long-term regulation of glycerol and nn-esterified fatty acid release by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 44, 55-62.
- Ross, S. E., Erickson, R. L., Hemati, N., et MacDougald, O. A. (1999). Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol* 19, 8433-8441.
- Rothwell, N. J., et Stock, M. J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31-35.
- Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T. R., Parijs, L. V., et Lodish, H. F. (2002). Tumor Necrosis Factor-alpha Supresses Adipocyte-Specific Genes and Activates Expression of Preadipocyte Genes in 3T3-L1 Adipocytes. Nuclear Factor-kappa B Activation by TNF-alpha Is Obligatory. *Diabetes* 51, 1319-1336.
- Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T. R., Parijs, L. V., et Lodish, H. F. (2002). Tumor Necrosis Factor-alpha Supresses Adipocyte-Specific Genes and Activates Expression of Preadipocyte Genes in 3T3-L1 Adipocytes. Nuclear Factor-kappa B Activation by TNF-alpha Is Obligatory. *Diabetes* 51, 1319-1336.

- Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., et McNiece, I. (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 14, 1431-1437.
- Satoh, T., et Hosakawa, M. (1998). The mammalian carboxylesterases : from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 256-288.
- Schulman, J. G., Shao, G., et Heyman, R. A. (1998). Transactivation by retinoid X receptor gamma (PPARgamma) heterodimers : intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol Cell Biol* 18, 3483-3494.
- Sethi, J. K., et Hotamisligil, G. S. (1999). The role of TNFalpha in adipocyte metabolism. *Cell & Developmental Biology* 10, 19-29.
- Sethi, J. K. et Vidal-Puig, A. (2005). Visfatin : the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes ?. *Trends in Molecular Medicine* 11 (8), 344-347.
- Shen, W. J., Sridhar, K., Bernlohr, D. A. et Kraemer, F. B. (1999). Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5528-32.
- Shitara, H., Sato, A., Hayashi, J., Mizushima, N., Yonekawa, H., et Taya, C. (2004). Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res* 13, 191-194.
- Slavin, B. G., Ong, E. M., et Kern, P. A. (1994). hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* 35, 1535-1541.
- Smirnova, E., Golberg, E. B., Makarova, K. S., Lin, L., Brown, W. J., et Jackson, C. L. (2005). ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO reports* 7, 106-113.

- Soni, K. G., Lehner, R., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Semache, M., Gao, W., Ashman, K., Pshezhetsky, A. V., et Mitchell, G. A. (2004). Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J Biol Chem* 279, 40683-40689.
- Soni, K. G., Lehner, R., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Semache, M., Gao, W., Ashman, K., Pshezhetsky, A. V., et Mitchell, G. A. (2004). Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J Biol Chem* 279, 40683-40689.
- Souza, S. C., de Vargas, L. M., Yamamoto, M. T., Lien, P., Franciosa, M. D., Moss, L. G., et Greenberg, A. S. (1998). Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 273, 24665-24669.
- Souza, S. C., Palmer, H. J., Kang, Y.-H., Yamamoto, M. T., Muliro, K. V., Paulson, K. E., et Greenberg, A. S. (2003). TNF-alpha Induction of Lipolysis Is Mediated Through Activation of the Extracellular Signal Related Kinase Pathway in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 89, 1077-1086.
- Souza, S. C., Palmer, H. J., Kang, Y.-H., Yamamoto, M. T., Muliro, K. V., Paulson, K. E., et Greenberg, A. S. (2003). TNF-alpha Induction of Lipolysis Is Mediated Through Activation of the Extracellular Signal Related Kinase Pathway in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 89, 1077-1086.
- Spiegelman, B. M., et Farmer, S. R. (1982). Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 29, 53-60.
- Spiegelman, B. M., et Farmer, S. R. (1982). Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 29, 53-60.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., et Strosberg, A. D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18, 213-215.

- Sumida, M., Sekiya, K., Okuda, H., Tanaka, Y., et Shiosaka, T. (1990). Inhibitory effect of tumor necrosis factor on gene expression of hormone sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem (Tokyo)* 107, 1-2.
- Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.
- Syu, L. J. et Saltiel, A. R. (1999). Lipotransin : a novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Mol. Cell.* 4, 109-15.
- Sztalryd, C., et Kraemer, F. B. (1994). Regulation of hormone-sensitive lipase during fasting. *Am J Physiol* 266, E179-185.
- Takahiko, M., et Constance, L. C. (2003). Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16-22.
- Talmud, P. J., Palmen, J., et Walker, M. (1998). Identification of genetic variation in the human hormone-sensitive lipase gene and 5' sequences : homology of 5' sequences with mouse promoter and identification of potential regulatory elements. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 661-668.
- Tang, Q.-Q., Tamara, C. O., Lane, M. D. (2003). Mitotic clonal expansion : A synchronous process required for adipogenesis. *PNAS* 100 (1), 44-49.
- Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U. T., Rao, B. S., Kiryutin, B., Galperin, M. Y., Fedorova, N. D., et Koonin, E. V. (2001). The COG database : new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Research* 29, 22-28.
- Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U. T., Rao, B. S., Kiryutin, B., Galperin, M. Y., Fedorova, N. D., et Koonin, E. V. (2001). The COG database : new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Research* 29, 22-28.

- Tijsterman, M., et Plasterk, R. H. (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1-3.
- Tiraby, C., et Langin, D. (2003). Conversion from white to brown adipocytes : a strategy for the control of fat mass ? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14, 439-441.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., et Langin, D. (2003). Acquisition of Brown Fat Cell Features by Human White Adipocytes. *J Biol Chem* 278, 33370-33376.
- Tontonoz, P., Graves, R. A., Budavari, A. I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., Tempst, P., et Spiegelman, B. M. (1994). Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptor, PPARgamma and RXRalpha. *Nucleic Acids Research* 22, 5628-5634.
- Tsigos, C., Papanicolaou, D. A., Kyrou, I., Defensor, R., Mitsiadis, C. S., et Chrousos, G. P. (1997). Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4167-4170.
- Valet, P., Tavernier, G., Castan-Laurell, I., Saulnier-Blache, J. S., et Langin, D. (2002). Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *Journal of Lipid Research* 43, 835-860.
- Vicario, P. P., Candelore, M. R., Schaeffer, M.-T., Kelly, L., Thompson, G. M., Brady, E. J., Saperstein, R., MacIntyre, E., Tota, L. M., et Cascieri, M. A. (1998). Desensitization of beta3-adrenergic receptor-stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats. *Life Sciences* 62, 627-638.
- Vicario, P. P., Candelore, M. R., Schaeffer, M.-T., Kelly, L., Thompson, G. M., Brady, E. J., Saperstein, R., MacIntyre, E., Tota, L. M., et Cascieri, M. A. (1998). Desensitization of beta3-adrenergic receptor-stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats. *Life Sciences* 62, 627-638.

- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K., et Sul, H. S. (2004). Desnutrin, an Adipocyte Gene Encoding a Novel Patatin Domain-containing Protein, Is Induced by Fasting and Glucocorticoids. *J Biol Chem* 279, 47066-47075.
- Voet, D., et Voet, J. G. (1998). *Biochimie*, De Boeck Université edn (Paris, Bruxelles).
- Vossier, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M.-G., Rim, C. S., et Stork, P. J. S. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89, 73-82.
- Vozarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P. A., Bogardus, C., et Pratley, R. E. (2001). Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action and insulin secretion. *Obes Res* 9, 414-417.
- Wallenius, V., Wallenius, K., Ahren, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S. L., Ohlsson, C., et Jansson, J. O. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine* 8.
- Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., Darlington, G. J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269 (5227), 1108-12.
- Wang, S. P., Chung, S., Soni, K., Bourdages, H., Herno, L., Trasler, J., et Mitchell, G. A. (2004). Expression of Human Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in Postmeiotic Germ Cells Confers Normal Fertility to HSL-Deficient Mice. *Endocrinology* 145, 5688-5693.
- Wang, S. P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M. A., Levy, E., Robert, M. F., Pan, L., Oligny, L., et Mitchell, G. A. (2001). The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res* 9, 119-128.

- Wang, S., Lapierre, P., Robert, M.-F., Nadeau, J. H., et Mitchell, G. A. (1994a). Hormone-sensitive lipase maps to proximal chromosome 7 in mice and is genetically distinct from the Ad and Tub loci. *Genomics* 24, 416-417.
- Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X., et Goldstein, J. L. (1994b). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77, 53-62.
- Wei, E., Lehner, R., et Vance, D. E. (2005). C/EBPalpha activates the transcription of triacylglycerol hydrolase in 3T3-L1. *Biochem J* 388, 959-966.
- Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S. C., Whitt, M. A., Chow, M., et Machaca, K. (2005). RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436, 1044-1047.
- Wong, H., et Schotz, M. C. (2002). The lipase gene family. *J Lipid Res* 43, 341-349.
- Wozniak, M., Schramm, N. L., et Limbird, L. E. (2000). The Noradrenergic Receptor Subtypes. *Psychopharmacology*.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., et Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., *et al.* (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.
- Yang, L.-Y., et Kuksis, A. (1991). Apparent convergence (at 2-monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerols. *J Lipid Res* 32, 1173-1186.

- Yang, R.-Y., Hsu, D. K., Chen, H.-Y., et Liu, F.-T. (2004). Galnectin-12 Is Required for Adipogenic Signaling and Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem* 279, 29761-29766.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L et Kahn, B. B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resisistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436 (7049), 356-62.
- Yeaman, S. J. (2004). Hormone-sensitive lipase - new roles for an old enzyme. *Biochem J* 379, 11-22.
- Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M., et McKnight, S. L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9, 168-181.
- Yue, C. C., Muller-Greven, P., Dailey, P., Lozanski, G., Anderson, V., et Macintyre, S. (1996). Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 22245-22250.
- Zabeau, L., Lavens, D., Peelman, F., Eyckerman, S., Vandekerckhove, J., et Tavernier, J. (2003). The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett* 546, 45-50.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., et Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et Zechner, R. (2004). Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* 306, 1383-1386.